

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Fries

**Immunhistologische Analyse der laminin-5-gamma-2 Kette in
VIN III und im Plattenepithelkarzinom der Vulva unter Be-
rücksichtigung der klinischen und histologischen Aspekte**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Isabelle Eisenhauer

aus
München

Jahr
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Kürzl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Huß
Prof. Dr. C. J. Thaler

Mitbetereuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. P. Hantschmann

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Präneoplasien und Neoplasien der Vulva.....	1
1.1.1	Vulväre intraepitheliale Neoplasie.....	2
1.1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.1.2	Ätiologie.....	2
1.1.1.3	Klinik.....	2
1.1.1.4	Histologie	4
1.1.1.5	Diagnose.....	4
1.1.1.6	Therapie.....	5
1.1.1.7	Prognose	6
1.1.2	Vulvakarzinom.....	6
1.1.2.1	Epidemiologie	6
1.1.2.2	Ätiologie.....	6
1.1.2.3	Klinik.....	7
1.1.2.4	Histologie	8
1.1.2.5	Diagnose.....	11
1.1.2.6	Therapie.....	12
1.1.2.7	Prognose	13
1.2	Tumorcharakterisierung.....	14
1.2.1	Tumorentstehung	14
1.2.2	Immunhistologische Prognosefaktoren.....	16
1.2.3	Laminin-5-gamma-2	18
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Patientinnenkollektiv.....	20

2.1.1	Erhebung klinischer und makropathologischer Befunde.....	20
2.1.2	Follow-up.....	21
2.2	Aufbereitung der Vulvapräparate	22
2.3	Histologie	22
2.3.1	Histologische Beurteilung der vulvären intraepithelialen Neoplasien	22
2.3.2	Histologische Beurteilung der Vulvakarzinome.....	23
2.4	Immunhistologie.....	25
2.4.1	Methodik der Immunhistologie	25
2.4.2	Auswertung der immunhistologischen Präparate	29
2.5	Statistik	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Vulväre intraepitheliale Neoplasie	32
3.1.1	Patientinnenkollektiv	32
3.1.2	Klinik und makropathologische Befunde	32
3.1.3	Follow-up.....	35
3.1.4	Histologie.....	35
3.1.4.1	Ergebnisse der histologischen Beurteilung	35
3.1.4.2	Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern...	37
3.1.5	Immunhistologie	39
3.1.5.1	Färbeergergebnisse von laminin-5-gamma-2.....	39
3.1.5.2	Histologische Parameter in Abhängigkeit von den Färbeergergebnissen.....	41
3.1.5.3	Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den Färbeergergebnissen.....	41
3.2	Vulvakarzinom.....	42
3.2.1	Patientinnenkollektiv	42
3.2.2	Klinik und makropathologische Befunde	42
3.2.3	Follow-up.....	47
3.2.4	Histologie.....	48
3.2.4.1	Ergebnisse der histologischen Beurteilung	48
3.2.4.2	Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von den histologischen Parametern ...	52
3.2.4.3	Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern...	57
3.2.4.4	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den histologischen Parametern.....	59
3.2.5	Immunhistologie	67

3.2.5.1	Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2	67
3.2.5.2	Histologische Parameter in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen	69
3.2.5.3	Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen	74
3.2.5.4	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen	75
4	Diskussion	77
4.1	Bedeutung der Arbeit	77
4.2	Diskussion über die Ergebnisse der vulvären intraepithelialen Neoplasie... 77	77
4.2.1	Histologie	77
4.2.2	Immunhistologie	78
4.3	Diskussion über die Ergebnisse des Vulvakarzinoms	80
4.3.1	Histologie	80
4.3.2	Immunhistologie	82
4.4	Schlussbetrachtung und Ausblick	85
5	Zusammenfassung	87
6	Abkürzungsverzeichnis	91
7	Literaturverzeichnis	93
8	Danksagung	103
9	Lebenslauf	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 VIN III – multifokales Auftreten.....	3
Abb. 1-2 VIN – basaloider Typ	4
Abb. 1-3 Vulvakarzinom a) exophytisch wachsender Tumor, b) Ulkus	8
Abb. 1-4 Vulvakarzinom a) hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom, b) verhorntes Plattenepithelkarzinom	10
Abb. 1-5 Radikaloperation der Vulva – unterschiedliche Umschneidungsfiguren	12
Abb. 1-6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Stadium.....	14
Abb. 1-7 Laminin-5	18
Abb. 2-1 Infiltrationstiefe des Plattenepithelkarzinoms der Vulva	24
Abb. 2-2 Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode	26
Abb. 3-1 Altersverteilung der VIN-Patientinnen bei Diagnosestellung	33
Abb. 3-2 Symptome bei VIN	33
Abb. 3-3 Lokalisation der VIN	34
Abb. 3-4 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung in VIN	40
Abb. 3-5 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung in VIN	40
Abb. 3-6 Altersverteilung der Vulvakarzinom-Patientinnen bei Diagnosestellung	43
Abb. 3-7 Symptome beim Vulvakarzinom	44
Abb. 3-8 Lokalisation der Vulvakarzinome	45
Abb. 3-9 Häufigkeit des Lymphknotenbefalls in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe..	53
Abb. 3-10 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit von der Mitosenzahl	54
Abb. 3-11 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom Grading	55
Abb. 3-12 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom pT-Stadium	56
Abb. 3-13 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	60
Abb. 3-14 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Grading	61
Abb. 3-15 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa	62
Abb. 3-16 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa	63
Abb. 3-17 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall.....	64

Abb. 3-18 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pT-Stadium	65
Abb. 3-19 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Entfernung in sano	66
Abb. 3-20 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom	67
Abb. 3-21 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom	68
Abb. 3-22 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom	68
Abb. 3-23 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	70
Abb. 3-24 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Grading	71
Abb. 3-25 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa	72
Abb. 3-26 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom pT-Stadium	73
Abb. 3-27 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Rezidiventwicklung	74
Abb. 3-28 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 ISSVD-Klassifikation der vulvären intraepithelialen Neoplasie	4
Tab. 1-2 Histologische Typen der malignen Vulvatumoren.....	9
Tab. 1-3 Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms	11
Tab. 2-1 Protokoll für immunhistologische Färbung.....	29
Tab. 2-2 Auswertungsschema der immunhistologischen Färbung.....	30
Tab. 3-1 Ersttherapie der VIN	34
Tab. 3-2 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der VIN	36
Tab. 3-3 Alter bezogen auf verschiedenen VIN-Typen.....	36
Tab. 3-4 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der VIN-Rezidive	37
Tab. 3-5 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern.....	38
Tab. 3-6 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der VIN-Entfernung in sano	38
Tab. 3-7 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN.....	39
Tab. 3-8 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN-Rezidiven	39
Tab. 3-9 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN in Abhängigkeit von den histologischen Parametern	41
Tab. 3-10 Färbeergebnisse der VIN in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall.....	42
Tab. 3-11 Zusätzliche Malignome bei Vulvakarzinom-Patientinnen.....	44
Tab. 3-12 Untersuchungsbefund bei Inspektion der Vulva	45
Tab. 3-13 Ersttherapie der Vulvakarzinome.....	46
Tab. 3-14 Lymphknotenentfernung in Abhängigkeit vom Operationsverfahren	46
Tab. 3-15 Häufigkeitsverteilung der Rezidive bei Vulvakarzinomen	47
Tab. 3-16 Histologischer Typ der Vulvakarzinome und Altersmittelwert.....	48
Tab. 3-17 Epithelveränderungen am Karzinomrand.....	48
Tab. 3-18 Infiltrationstiefe der Vulvakarzinome	49
Tab. 3-19 Entzündungsreaktion der Vulvakarzinome	49
Tab. 3-20 Mitosenzahl der Vulvakarzinome	50
Tab. 3-21 Nekrosen der Vulvakarzinome.....	50

Tab. 3-22 Grading der Vulvakarzinome	50
Tab. 3-23 Lymphangiosis carcinomatosa der Vulvakarzinome	51
Tab. 3-24 Hämangiosis carcinomatosa der Vulvakarzinome	51
Tab. 3-25 Lymphknotenbefall	51
Tab. 3-26 pT-Stadium der Vulvakarzinome	52
Tab. 3-27 Entfernung in sano der Vulvakarzinome.....	52
Tab. 3-28 Lymphknotenentfernung und Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	53
Tab. 3-29 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Mitosenzahl.....	54
Tab. 3-30 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit vom Grading	55
Tab. 3-31 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa....	55
Tab. 3-32 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit vom pT-Stadium	56
Tab. 3-33 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit vom pT-Stadium.....	57
Tab. 3-34 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von der Entfernung in sano	57
Tab. 3-35 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	58
Tab. 3-36 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall	58
Tab. 3-37 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit vom pT-Stadium.....	59
Tab. 3-38 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der Entfernung in sano.....	59
Tab. 3-39 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	60
Tab. 3-40 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom Grading	61
Tab. 3-41 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa	62
Tab. 3-42 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa ..	63
Tab. 3-43 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall.....	64
Tab. 3-44 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom pT-Stadium	65
Tab. 3-45 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Entfernung in sano.....	66
Tab. 3-46 Färbeergergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei Vulvakarzinomen	67
Tab. 3-47 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe	69
Tab. 3-48 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit von den Nekrosen.....	70
Tab. 3-49 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit vom Grading.....	71
Tab. 3-50 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa	72
Tab. 3-51 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa	73
Tab. 3-52 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit vom pT-Stadium.....	73

Tab. 3-53 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit von der Rezidiventwicklung.....	74
Tab. 3-54 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall.....	75
Tab. 3-55 Färbeergergebnisse in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben.....	76

1 Einleitung

Das Vulvakarzinom macht 4% aller weiblichen Genitalmalignome aus (Coulter and Gleeson, 2003).

Therapie der Wahl ist die Operation. Sie ist allerdings mit hoher Morbidität belastet. Deswegen beschäftigt sich diese Arbeit mit histologischen und immunhistologischen Parametern, die Aussage über den wahrscheinlichen Verlauf der Krankheit erlauben und damit zur individualisierten, tumoradaptierten Therapie herangezogen werden könnten.

Die laminin-5-gamma-2 Kette wird bei verschiedenen Tumoren, wie dem Plattenepithelkarzinom der Zervix oder des Mundes, an der Tumorinvasionsfront exprimiert. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob mit der immunhistologischen Anfärbung der laminin-5-gamma-2 Kette an der Invasionsfront die frühe Invasivität des Vulvakarzinoms markiert und dargestellt werden kann. Weiterhin wurde die klinische Wertigkeit von laminin-5-gamma-2 als Prognosefaktor für Lymphknotenbefall, Rezidive und Gesamtüberleben im Vergleich zu klassischen histopathologischen Parametern analysiert.

Um ein komplettes Bild vom Vulvakarzinom und seinen Vorstufen zu bekommen, werden im folgenden Abschnitt allgemeine Fakten über das Krankheitsgeschehen zusammengefasst.

1.1 Präneoplasien und Neoplasien der Vulva

Bei den bösartigen Erkrankungen der Vulva werden Präneoplasien und maligne Neoplasien unterschieden. Unter einer Präneoplasie versteht man eine Gewebeveränderung, die mit einem statistisch erhöhten Entartungsrisiko behaftet ist. Als histologische Gewebeveränderungen treten zelluläre Atypien auf, die zuerst nur intraepithelial zu finden sind. Kommt es zum Einbruch in das subepitheliale Stroma entstehen maligne Neoplasien, unter denen im Bereich der Vulva das Plattenepithelkarzinom zahlenmäßig am häufigsten vorkommt.

1.1.1 Vulväre intraepitheliale Neoplasie

Zu den Präneoplasien der Vulva zählen zum einen der vom Plattenepithel ausgehende squamöse Typ, die vulväre intraepitheliale Neoplasie und zum anderen die nicht-plattenepithelialen Läsionen, als nicht-squamöser Typ bezeichnet, der Morbus Paget und das Melanoma in situ. Die vulväre intraepitheliale Neoplasie ist prozentual gesehen am häufigsten vertreten und wird im folgenden Abschnitt näher erläutert. (Küppers und Bender, 2001)

1.1.1.1 Epidemiologie

Das mittlere Erkrankungsalter für Patientinnen, die an vulvärer intraepithelialer Neoplasie erkranken, beträgt 46 Jahre (Seters et al., 2005). Die Inzidenz nimmt vor allem bei Frauen unter 50 Jahren zu (Preti et al., 2005), was zum einem an veränderten sexuellen Gewohnheiten mit erhöhtem Risiko der Übertragung von humanen Papillomaviren (HPV) zum anderen auch an verbesserter Diagnostik liegen könnte (Gastrell und McConnell, 2001).

1.1.1.2 Ätiologie

Eine entscheidende Rolle in der Ätiologie einer vulvären intraepithelialen Neoplasie spielt vermutlich eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV). Den unterschiedlichen Studien zu Folge ergibt sich eine Prävalenz eines HPV-DNA-Nachweises bei VIN zwischen 40-90% (Kagie et al., 1997). Es wurden vor allem die HPV-Typen nachgewiesen, denen ein hohes onkogenes Risiko zugeschrieben wird, wie HPV 16, 18, 33 und 45, wobei der Nachweis von HPV 16 am häufigsten gelang (van Beurden et al., 1998; Engelmann et al., 2003).

Andere Risikofaktoren für die Erkrankung an einer vulvären intraepithelialen Neoplasie sind der Zigarettenkonsum, sexuell übertragbare Krankheiten mit HIV oder Herpes simplex Virus 2 und immunsuppressive Therapie (van Beurden et al., 1998; Jones et al., 2005; Preti et al., 2005).

1.1.1.3 Klinik

Die Symptome der vulvären intraepithelialen Neoplasie sind nicht spezifisch und fehlen in ungefähr der Hälfte der Fälle völlig. Dadurch kommt es häufig durch nicht Bemerken bzw. Ignorieren des Befundes seitens der Patientinnen oder durch Fehlinterpretation des behandelten Arztes zu einem Verschleppen der Erkrankung.

Als unspezifische Symptome werden Pruritus vulvae, unklare Schmerzen und Wundgefühl mit Brennen, Stechen oder Nässen angegeben. (van Seters et al., 2005)

Bei der Inspektion der Vulva imponieren häufig Veränderung der Hautfarbe und des Oberflächenreliefs. An Pigmentanomalien findet man von rötlicher über schwärzliche Hautfarbe bis hin zu Leukoplakien alles. Bei der Betrachtung der Oberfläche können sich schuppige, psoriasis-ähnliche Hautveränderungen, oberflächliche Erosionen oder exophytäre Wucherungen zeigen. (Preti et al., 2005)



Abb. 1-1 VIN III – multifokales Auftreten (1) (Singer und Monaghan, 2000).

Multifokales Auftreten, das bedeutet mehrere Stellen der Vulva sind betroffen, lässt sich bei 49% aller vulvären intraepithelialen Neoplasien nachweisen (van Seters et al., 2005).

In 32% der Fälle finden sich Neoplasien an mehreren Organen, das heißt sie treten multizentrisch auf (van Seters et al., 2005). Sie sind meist mit Zervix- oder Vaginalkarzinomen und ihren Vorstufen vergesellschaftet.

1.1.1.4 Histologie

Die Nomenklatur für die Klassifikation vulvärer intraepithelialer Neoplasien basiert auf einem Vorschlag der „International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD)“. In Tab. 1-1 sind die verschiedenen Formen aufgelistet.

Tab. 1-1 ISSVD-Klassifikation der vulvären intraepithelialen Neoplasie (Sideri et al., 2005).

VIN – gewöhnlicher Typ

- a. VIN, warty Typ
- b. VIN, basaloider Typ
- c. VIN, gemischter (warty/ basaloide) Typ

VIN – differenzierter Typ

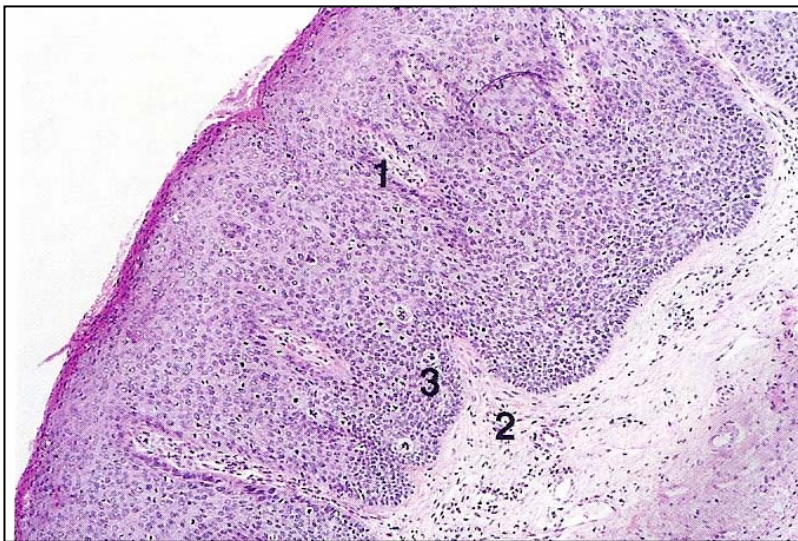


Abb. 1-2 VIN – basaloider Typ, atypische Zellen in der gesamten Dicke des Epithels (von 1 bis 3), subdermale Hyalinisierung (2) (Singer und Monaghan, 2000).

1.1.1.5 Diagnose

Bei jeder gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung sollte die Vulva genau inspiziert werden. Bei auffälligen Arealen kann die Untersuchung durch die Kolposkopie und unter Umständen mit der Toluidinblau-(2%)-Probe (Collins-Test), die allerdings sehr unspezifisch ist, oder dem Essigsäuretest ergänzt werden. (Kagie und Ansink, 2000)

Da wie oben beschrieben die Dysplasien meist multizentrisch auftreten, ist eine sorgfältige Untersuchung des gesamten Anogenitaltraktes unerlässlich (Preti et al., 2005).

Palpatorisch können Verhärtungen, Verdichtungen und Niveaudifferenzen festgestellt werden.

Verdächtige makroskopisch oder kolposkopisch inspizierte Bezirke sollten durch eine Biopsie einer repräsentativen Stelle abgeklärt werden, da eine Abstrichzytologie alleine keine zuverlässige Aussage ermöglicht. Die Gewebeentnahme kann entweder durch eine Stanzbiopsie oder eine Exzisionsbiopsie erfolgen. Bei multifokalen Läsionen sollte an mehreren Stellen eine Biopsie entnommen werden. (Gastrell und McConnell, 2001; Preti et al., 2005)

1.1.1.6 Therapie

Bei der Behandlung von präneoplastischen Vulvaläsionen haben sich verschiedene Therapiekonzepte in Abhängigkeit von der Histologie, der Ausdehnung, der Lokalisation der Erkrankung und dem Alter der Patientin etabliert (Preti et al., 2005).

Eine Therapiemöglichkeit ist die operative Entfernung der Läsion. Dabei werden die lokale Exzision, die Skinning-Vulvektomie und einfache Vulvektomie unterschieden. Die lokale Exzision wird vorzugsweise bei kleineren genau lokalisierten, aber auch bei multizentrischen Läsionen mit mehreren Ausschneidungen durchgeführt. Falls von der Lokalisation durchführbar, sollte das Exzidat mindestens einen Randsaum von 5 mm beinhalten (Cardosi et al., 2001). Bei sehr großen oder multizentrischen Befunden ist eine Skinning-Vulvektomie erforderlich. Dabei wird die Epithel- und obere Koriumschicht der Haut in einer Tiefe von 3-5 mm abgetragen. Das subkutane Gewebe und damit die Form der Vulva bleiben erhalten. Je nach Ausdehnung wird der Defekt eventuell durch Hauttransplantate ersetzt. (Monaghan, 1999) Eine einfache Vulvektomie, bei der die gesamte Haut und ein Teil des subkutanen Gewebes entfernt wird, führt man hauptsächlich bei älteren Patientinnen durch, bei denen das Risiko für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms erhöht ist (Cardosi et al., 2001).

Eine andere Therapiemöglichkeit ist die Lasertherapie. Die Evaporisierung mit dem Laser erzielt gute kosmetische Ergebnisse und ist besonders bei klitorisnahen und perinalen Läsionen empfehlenswert. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass anschließend das Gewebe histologisch nicht beurteilt werden kann. Bei der Laserexzision hingegen bleibt die ausgeschnittene Veränderung erhalten und kann histologisch aufgearbeitet werden. (Sideri et al., 1999)

In manchen Fällen ist es sinnvoll die lokale Exzision mit der Laserbehandlung zu kombinieren (Preti et al., 2005).

Alternative Behandlungskonzepte sind zum einen die photodynamische Therapie oder die medikamentöse Therapie mit Imiquimod, wobei beide als experimentell gelten (Preti et al., 2005).

1.1.1.7 Prognose

Behandelte vulväre intraepitheliale Neoplasien sind mit einer hohen Rezidivrate behaftet, die unabhängig von der angewendeten Behandlungsmethode bei 18-23% liegt (van Seters et al., 2005). Deswegen sollten engmaschige Nachsorgekontrollen durchgeführt werden.

Die Häufigkeit von Lokalrezidiven ist mit der Entfernung des Tumors vom Absetzungsrand, der Multifokalität der Primärläsion und persistierenden Condylomata acuminata mit latenten humanen Papillomaviren assoziiert (Küppers et al., 1997; Modesitt et al., 1998; van Seters et al., 2005).

1.1.2 Vulvakarzinom

1.1.2.1 Epidemiologie

Das Vulvakarzinom gehört zu den seltenen Tumorerkrankungen der Frau und macht 3-5% aller gynäkologischen Malignome aus (Coulter und Gleeson, 2003).

Die Gesamtinzidenz beläuft sich auf 1,5-3 / 100.000 Frauen pro Jahr.

Mit einer Inzidenz von 25 pro 100.000 Frauen kommt es gehäuft in der Altersgruppe der über 75-jährigen vor. So erkranken 80% im Alter zwischen 50 und 84 Jahren, 24% sind jünger als 60 Jahre (Engel et al., 2001). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 67 Jahre. (www.krebsinfo.de/ki/epidaten/pdf/inz2001.pdf)

1.1.2.2 Ätiologie

Die Karzinogenese des Vulvakarzinoms ist bis heute noch nicht in ihrer ganzen Komplexität geklärt. Spezifische Ursachen für die Entstehung sind nicht bekannt. Somit wird wie bei der vulvären intraepithelialen Neoplasie eine multifaktorielle Genese angenommen.

Die Prävalenz eines HPV-DNA-Nachweises bei Vulvakarzinomen wird je nach Studie mit 13-48% angegeben und ist damit niedriger als bei den vulvären intraepithelialen Neopla-

sien. Nachgewiesene HPV-Typen sind vor allem HPV 16 und 18. (Koyamatsu et al., 2003; Ngan et al., 1999)

Auf Grund des gehäuftten Auftretens von HPV bei jüngeren Frauen wird angenommen, dass ätiologisch zwei verschiedene Tumorentitäten vorliegen. Einmal das Vulvakarzinom der jüngeren Patientin mit positivem HPV-Nachweis und einer Histologie vom undifferenzierten, sprich basaloiden oder kondylomatösen Typ. Zum anderen das hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinom der älteren Frauen, das selten mit einer HPV-Infektion vergesellschaftet ist. Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, ob wirklich zwei Entitäten voneinander unterschieden werden können. (Hillemanns und Kimmig, 2001)

Andere Risikofaktoren sind der Zigarettenkonsum oder immunsuppressive Therapie. Chronische Genitalentzündungen, Genitalwarzen oder Lichen sclerosus kommen oft bei Patientinnen mit Vulvakarzinom vor. (Tyring, 2003)

Bei Patientinnen mit VIN III muss in 9% ohne Behandlung und in 3,3% mit Behandlung mit einem Übergang in ein invasives Karzinom gerechnet werden. (van Seters et al., 2005)

1.1.2.3 Klinik

Symptome höhergradiger Dysplasien und frühinvasiver Vulvakarzinome unterscheiden sich häufig nicht voneinander. Wie schon bei den vulvären intraepithelialen Neoplasien erläutert, handelt es sich um unspezifische Symptome, wie Pruritus vulvae, unklare Schmerzen, Wundgefühl mit Brennen, Stechen oder Nässen und Dyspareunie. Bei fortgeschrittenen Karzinomen kommen leichte Blutungen, Ausfluss und Dys- und Hämaturie bei Urethrabefall hinzu. (Tyring, 2003)

Das Aussehen des Tumors ist vielfältig. Bei der Inspektion der Vulva treten minimal invasive Karzinome wie vulväre intraepitheliale Neoplasien als rötliche bis weißliche Läsionen in Erscheinung. Fortgeschrittene Malignome imponieren als exophytisch wachsende Tumoren mit blumenkohlartiger Wucherung oder als endophytisch wachsende Ulzerationen mit induriertem Randwall. (Schnürch, 2004)

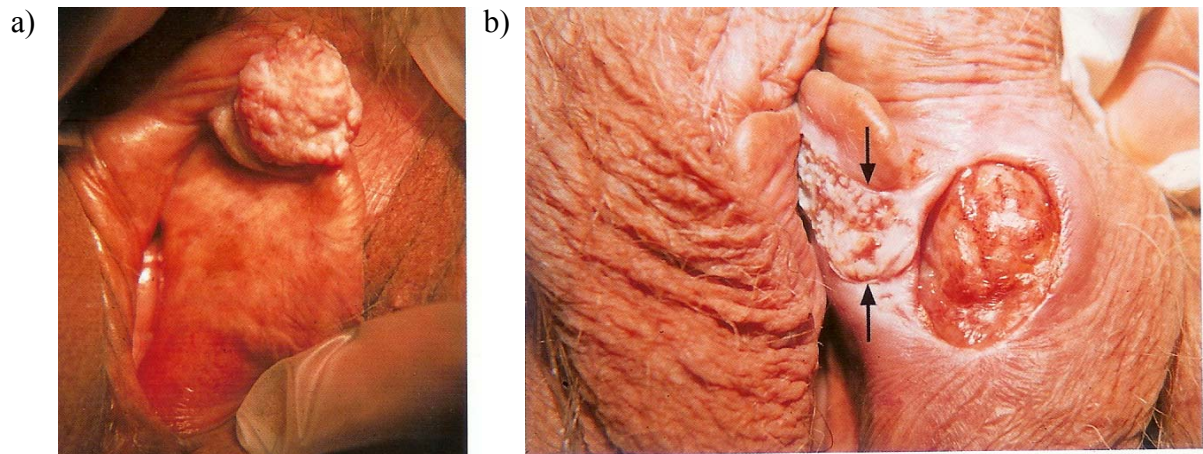


Abb. 1-3 Vulvakarzinom (Nauth, 2002)

a) exophytisch wachsender Tumor an der Innenseite der linken kleinen Labie

b) Ulkus an der linken großen Labie mit Übergreifen auf die kleine Labie in Form einer Leukoplakie.

Die größte Zahl der Tumoren ist im Bereich der Labien (80%), vor allem der Labia majora lokalisiert. Seltener entstehen Vulvakarzinome im Klitorisbereich (10%) und an der hinteren Kommissur, bzw. dem Perineum (10%) (Schnürch, 2004).

Bei der Tumorausbreitung unterscheidet man drei Wege. Einmal die kontinuierliche Ausdehnung, bei der in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors ein Befall von Urethra, Vagina, Perineum und Anus möglich ist. Zum zweiten die lymphogene Metastasierung, die als Folge der außerordentlich reichen lymphatischen Versorgungen der Vulva frühzeitig erfolgt. Sie breitet sich entlang des anatomischen Lymphabflussgebietes von oberflächlichen und tiefen inguinalen, subinguinalen und femoralen Lymphknoten über iliakale Lymphknoten des kleinen Beckens zu den paraaortalen Lymphknoten aus. In Abhängigkeit von Größe, Lokalisation und Aggressivität des Karzinoms, ist die Metastasierung primär ipsilateral oder bilateral möglich. Der dritte Weg der Tumorausbreitung, die hämatogene Metastasierung, ist hingegen ausgesprochen selten und tritt meistens erst nach lymphatischer Streuung auf. (Hopkins und Nemunaitis-Keller, 2001)

1.1.2.4 Histologie

Bei den malignen Neoplasien der Vulva werden verschiedene histologische Typen unterschieden (siehe Tab. 1-2). Die weitaus größte Gruppe bilden die Plattenepithelkarzinome mit ungefähr 90%. Sie werden in folgende Subtypen unterteilt: verhornendes, meist besser

differenziertes und unverhornendes Plattenepithelkarzinom, basaloïdes Karzinom, kondylomatöses oder warty type Karzinom und verruköses Karzinom.

Das zweithäufigste Vulvamalignom ist das maligne Melanom. Es macht 2-5% aller bösartigen Vulvatumoren aus.

Selten treten Basaliome und glanduläre Läsionen, zu denen Karzinome der Bartholinischen Drüsen oder Schweißdrüsenkarzinome gehören, auf. Zahlenmäßig spielen die malignen Weichgewebstumoren, die in verschiedene Sarkomtypen unterteilt werden, nahezu keine Rolle. (Diebold und Mayr, 2001; Rollason, 2000)

Tab. 1-2 Histologische Typen der malignen Vulvatumoren.

Plattenepitheliale Tumoren

Plattenepithelkarzinom

- verhornend
- unverhornend

basaloïdes Karzinom

kondylomatöses Karzinom

verruköses Karzinom

malignes Melanom

Basaliom

Glanduläre Tumoren

Karzinom der Bartholinischen Drüsen

Schweißdrüsenkarzinom

Karzinom ausgehend von ektopischem Mammakarzinom

Adenokarzinom anderer Typen

maligne Weichgewebstumoren

Der histologische Differenzierungsgrad, auch Grading genannt, wird in drei Grade eingeteilt: G1: hochdifferenziert, G2: mäßig differenziert und G3: gering differenziert (Benedet et al., 2000). Je weniger differenziert ein Tumor ist, umso höher ist der Malignitätsgrad.

Beim infiltrativen Wachstum können Tumoren in Lymphgefäße (Lymphangiosis carcinomatosa) und Blutgefäße (Hämangiosis carcinomatosa) einbrechen.

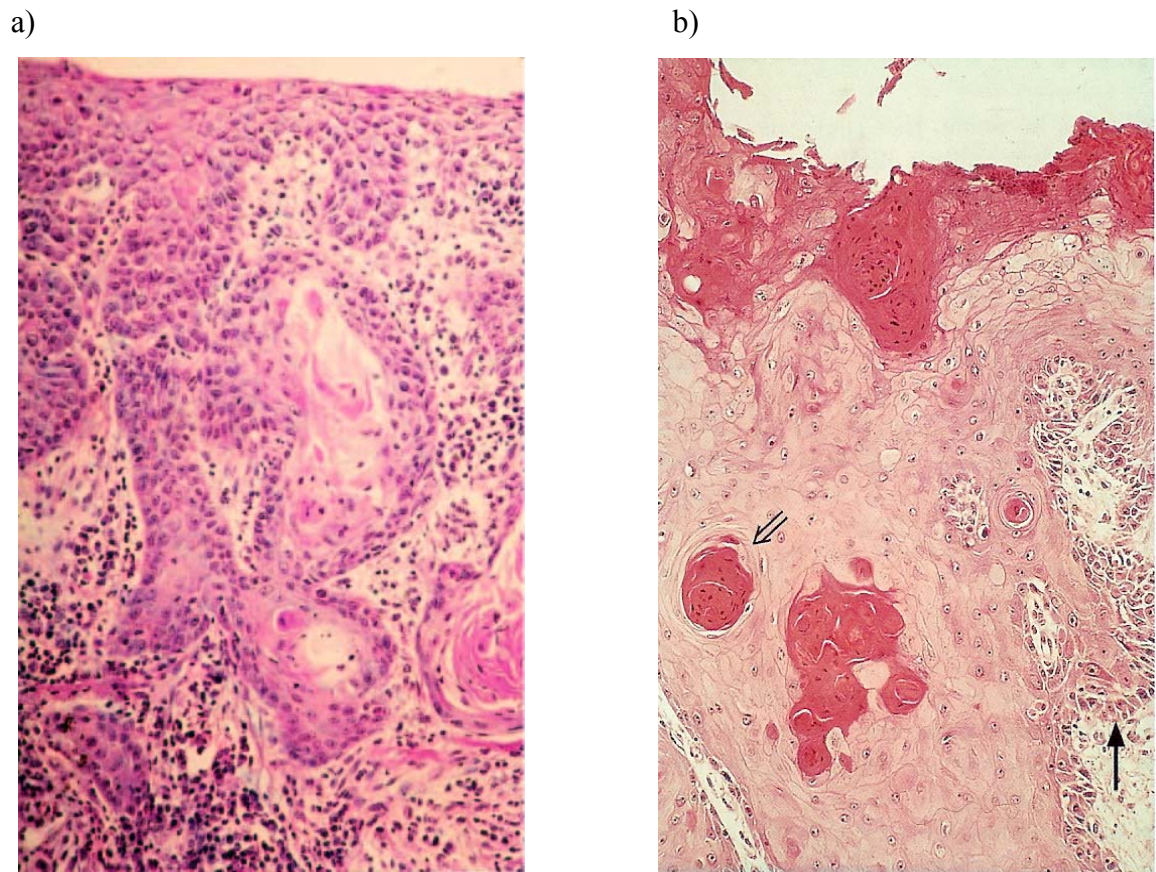


Abb. 1-4 Vulvakarzinom

a) hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit Infiltration des subepithelialen Bindegewebes (Kimmig und Kürzl, 2001)

b) verhorntes Plattenepithelkarzinom; → undifferenzierter Anteil unverhornter Zellen, ⇒ hochdifferenzierter Anteil verhornter Zellen (Nauth, 2002).

Die Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms erfolgt unter Berücksichtigung der klinischen und histologischen Befunde. Bei der Aufarbeitung des Tumors werden die Größe des Primärtumors und die Invasionstiefe beurteilt. Weiterhin fließen die Lokalisation befallener Lymphknoten und die Fernmetastasen in die Einteilung mit ein. An Hand dieser Kriterien erfolgt dann die Klassifikation in TNM- und FIGO-Stadien (siehe Tab. 1-3). (Benedet et al., 2000)

Tab. 1-3 Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms.

FIGO-Stadium	TNM-Klassifikation	Kriterien
0	Tis	Carcinoma in situ
IA	T1a N0 M0	Tumor begrenzt auf Vulva und Perineum, Durchmesser ≤ 2 cm, Infiltrationstiefe ≤ 1 mm
IB	T1b N0 M0	Tumor begrenzt auf Vulva und Perineum, Durchmesser ≤ 2 cm, Infiltrationstiefe > 1 mm
II	T2 N0 M0	Tumor begrenzt auf Vulva und Perineum, Durchmesser > 2 cm
III	T3 N0/1 M0	Tumor mit Übergang auf Urethra, Vagina, Damm oder Anus
	T1/2 N1 M0	oder Tumor begrenzt auf Vulva und Perineum, einseitiger Lymphknotenbefall
IVA	T4 N0-2 M0	Tumor mit Infiltration der Schleimhaut von Blase, Urethra oder Rektum oder mit Fixation am Knochen
	T1-3 N2 M0	und / oder beidseitiger Lymphknotenbefall
IVB	T1-4 N1-2 M1	Fernmetastasen

1.1.2.5 Diagnose

Makroskopisch lassen sich frühinvasive Karzinome nicht von vulvären intraepithelialen Neoplasien unterscheiden. Daher kommen die gleichen diagnostischen Maßnahmen in Frage.

Wie schon bei der Diagnose der vulvären intraepithelialen Neoplasien erwähnt, ist die gynäkologische Untersuchung mit Inspektion, Palpation und Kolposkopie eventuell mit Essigsäure-Test wichtig. Dabei ist besonders darauf zu achten, ob ein Übergreifen auf Vagina, Perineum oder Anus besteht. Die klinische Diagnose des Vulvakarzinoms ist durch Stanzbiopsie histologisch zu bestätigen. (Kürzl, 2001; Leitlinien der DGGG, 2004)

Bei makroskopischem Befall des Anus ist eine Rektoskopie, bei Befall der Urethramündung bzw. Übergreifen auf die vordere Vaginalwand eine Zystoskopie angezeigt (Kürzl, 2001; Leitlinien der DGGO, 2004).

1.1.2.6 Therapie

Das Prinzip der Therapie des Vulvakarzinoms besteht heute aus einer stadienadaptierten, individuell ausgerichteten therapeutischen Strategie. An erster Stelle steht, wenn möglich immer der operative Eingriff mittels lokaler radikaler Exzision, Hemivulvektomie oder radikaler Vulvektomie gegebenenfalls mit vorderer und/oder hinterer Exenteration. Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors wird entweder eine ipsilaterale oder bilaterale Lymphonodektomie durchgeführt. Dabei kommt die Dreischnitt-Technik mit einem separaten inguinalen Schnitt zu Entfernung inguinaler Lymphknoten, die die frühere En-Bloc-Resektion ersetzt hat, zur Anwendung. (Dhar und Woolas, 2003) (siehe Abb. 1-5)

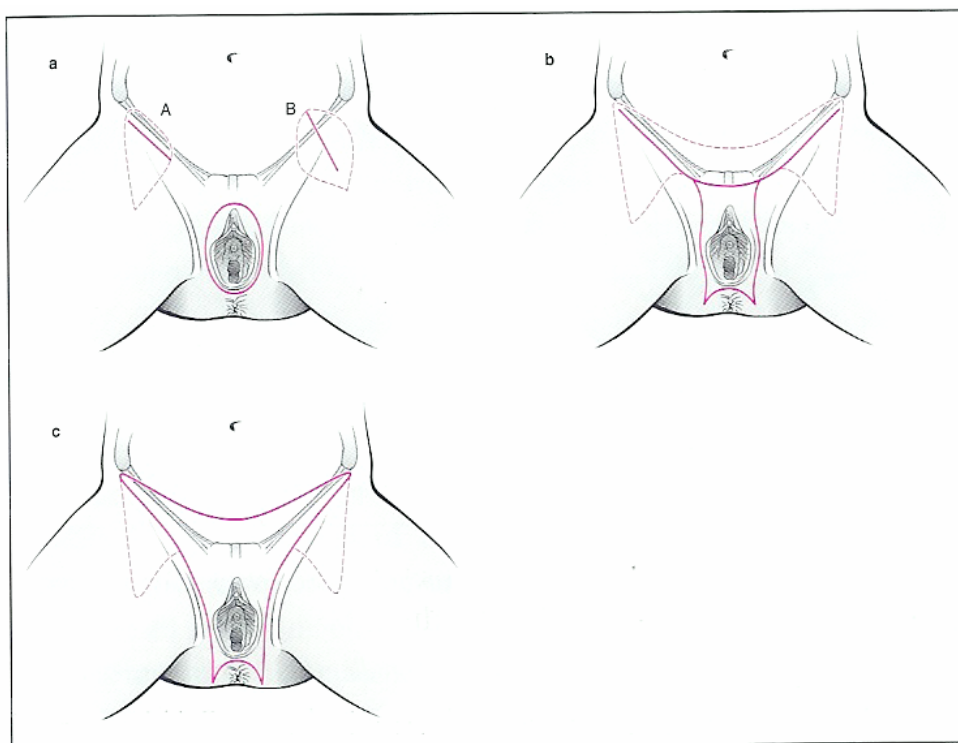


Abb. 1-5 Radikaloperation der Vulva – unterschiedliche Umschneidungsfiguren (Küppers und Bender, 2003)

a) radikale Vulvektomie mit separater beidseitiger inguino-femorale Lymphonodektomie

A = quere Inzision knapp unterhalb des Leistenbandes

B = Längsinzision

b) „En-bloc-Resektion“

c) klassische „En-bloc-Resektion“ nach Way.

Bei Befall der inguinalen Lymphknoten erfolgt neben lokaler Radiatio die pelvine Lymphonodektomie oder die perkutane Bestrahlung des pelvinen Lymphabflussgebietes (van der Velden, 2000).

Da inguinale Lymphonodektomie eine deutlich erhöhte Morbidität zeigt, wird die Sentinel-Lymphonodektomie diskutiert. Diese ist Gegenstand laufende Studien, kann jedoch noch nicht als Routineverfahren empfohlen werden. (Hantschmann, 2006)

Die Strahlentherapie kommt bei Resektionen, die nicht im Gesunden erfolgt sind, oder bei nachgewiesenem Lymphknotenbefall zum Einsatz (Jhingran und Eifel, 2000). Inoperable Fälle oder Lokalrezidive können primär strahlentherapeutisch behandelt werden (Blake, 2003).

Komplikationen der Operation betreffen zum einen die Vulvektomiewunde mit Wundheilungsstörungen in bis zu 50% der Fälle. Zum anderen kann durch die Lymphonodektomie in der Leiste Lymphödeme in den Beinen, Serom- oder Lymphozelenbildung in der Leiste, Parästhesien im Innervationsgebiet des Nervus femoralis und Thromboembolien entstehen (Gaarenstroom et al., 2003; Lavie et al., 1999; Leminen et al., 2000). Bei der radikalen Vulvektomie kann es durch Schrumpfung von Introitus bzw. Vagina zur Störung der sexuellen Funktionalität mit Einschränkung der Kohabitationsfähigkeit kommen (Green et al., 2000).

1.1.2.7 Prognose

Bei etwa jeder dritten Patientin ist mit einem Rezidiv der Erkrankung zu rechnen. 80% der Rezidive treten in den ersten 2 Jahren nach Operation auf und sind in der Mehrzahl Lokalrezidive im Bereich der Vulva. (Coulter und Gleeson, 2003)

Die Häufigkeit von Lokalrezidiven korreliert mit der Tumorgroße, der Infiltrationstiefe, der Hämangiosis carcinomatosa, dem FIGO-Stadium und den metastatisch befallenen Lymphknoten (Maggino et al., 2000).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen mit Vulvakarzinom zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Stadium (siehe Abb. 1-6).

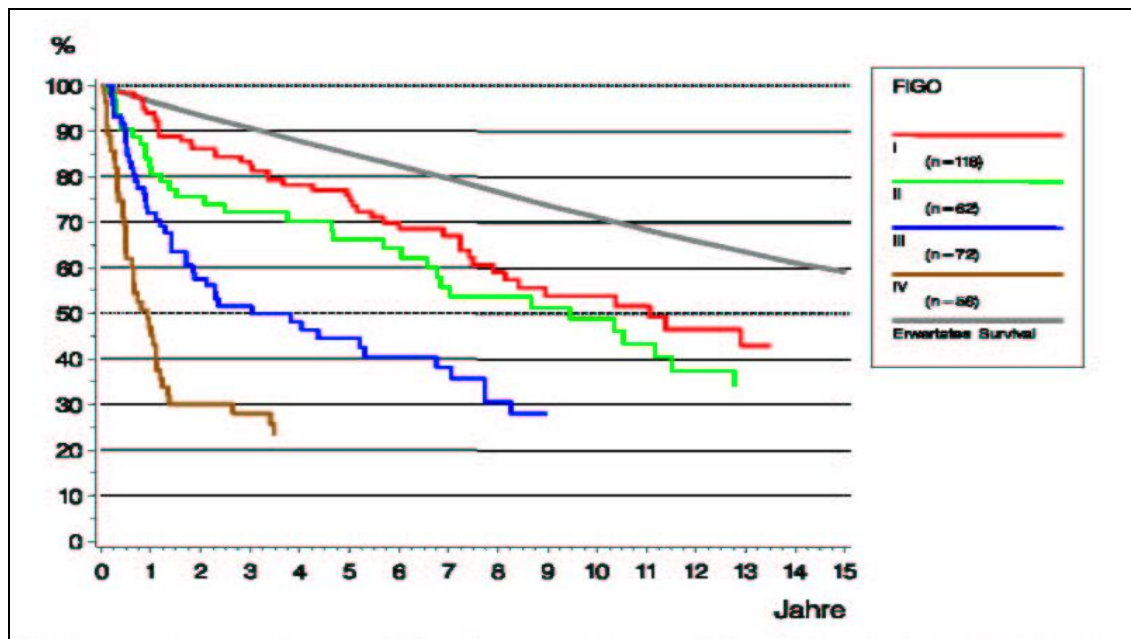


Abb. 1-6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Stadium (Engel et al., 2001).

Von entscheidendem Einfluss auf die Überlebensprognose ist der Nodalstatus der inguinalen Lymphknoten (Bosquet et al., 2005; Burger et al., 1995; Kürzl und Messerer, 1989; Rouzier et al., 2001). Prädiktiv für das Auftreten von Metastasen sind die Invasionstiefe, die Tumordicke, das histologische Grading, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa (Bjerregaard et al., 1993).

Andere prognostische Faktoren sind die Infiltrationstiefe, der histologische Differenzierungsgrad und das Tumorstaging (Hoffmann et al., 1999; Hopkins et al., 1991; Rouzier et al., 2001).

Wie bei jeder Tumorerkrankung sollte in regelmäßigen Abständen Nachsorgeuntersuchungen mit sorgfältiger klinischer Kontrolle durchgeführt werden (für 3 Jahre alle 3 Monate, dann für 2 Jahre alle 6 Monate und ab dem 6. Jahr einmal jährlich) (Schnürch, 2004).

1.2 Tumorcharakterisierung

1.2.1 Tumorentstehung

Bei malignen Tumoren kommt es zu geweblichen Neubildungen in Form eines spontanen, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe, das von Regulations- und Regenerationsmechanismen des Körpers abgekoppelt ist. Nach dem Mo-

dell der Mehrschrittkarzinogenese ist dies das Resultat eines in mehreren Schritten verlaufenden Prozesses.

Die Tumorentstehung ist besonders gut beim kolorektalen Karzinom als Adenom-Karzinom-Sequenz untersucht. Hierbei wird angenommen, dass auf dem Weg von normalen Epithelzellen über Zwischenstufen bis zur malignen Entartung eine Vielzahl genetischer Veränderungen mit Mutation oder Verlust von Genen akkumulieren. (Ilyas et al., 1999; Sedivy et al., 2000)

Für andere Tumoren ist kein so enger Zusammenhang bei der Tumorentstehung bekannt. Auf molekularer Ebene sind viele Faktoren dafür verantwortlich, dass letztlich ein maligner Tumor entsteht.

Eine entscheidende Rolle spielt die erhöhte oder unkontrollierte Proliferation durch Umwandlung von Protoonkogenen, welche physiologischerweise mit Hilfe von intrazellulärer Signaltransduktion Zellwachstum und Differenzierung steuern, zu Onkogenen durch Mutation, Genamplifikation oder Überexpression. Die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der Verlust oder die Inaktivierung in wachstumshemmenden Genen (Tumorsuppressorgenen) sind ebenfalls am überschießenden Zellwachstum beteiligt.

Ein weiterer entscheidender Schritt auf dem Wege der Tumorgenese sind die Differenzierungsstörungen von Tumorzellen. Dabei verlieren einzelne Zellen ihre Differenzierungsmerkmale. Damit einhergehend bricht auch die Zell-Zell-Kommunikation ab. Fehlende oder funktionslose Adhäsionsmoleküle führen somit zu einer von Nachbarzellen unbeeinflussbaren Zellteilung und zu einem Ausbruch der Zellen aus dem Zellverband. (Riede et al., 2004)

Andere Faktoren, die auf die Entstehung von Tumoren Einfluss nehmen können, sind Hormone, Viren, immunologische Defektzustände und Karzinogene wie Chemikalien oder Strahlen. (Riede et al., 2004)

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen in vielerlei Hinsicht. Sie wachsen schnell, invasiv und destruktiv, sind entdifferenziert und können in Lymph- und Blutgefäße einbrechen. Morphologisch verlieren die Tumorzellen mit zunehmender Entdifferenzierung den Aufbau und die Anordnung ihres Zytoskeletts und exprimieren unvollständige oder andere extrazelluläre Makromoleküle (Riede et al., 2004).

1.2.2 Immunhistologische Prognosefaktoren

Bei einigen Tumoren haben verschiedene Faktoren, die das Auftreten oder das Fortschreiten maligner Tumoren auf molekularer Ebene beeinflussen, entscheidend zum Krankheitsverständnis und zur Planung einer tumoradaptierten Therapie beigetragen. In letzter Zeit beschäftigten sich verschiedene Studien mit der Rolle dieser tumorcharakterisierenden Faktoren an der Entstehung und Fortschreitung maligner Vulvatumoren und deren Relevanz für die Überlebensprognose der Tumorerkrankten. Sie lassen sich mit Hilfe der Immunhistochemie darstellen. Im Folgenden werden sie näher beschrieben.

Eine Mutation im Gen p53 und damit einhergehendem Verlust der suppressiven Wirkung auf die Zellproliferation stellt eine der häufigsten genetischen Veränderungen in malignen Tumoren dar (Scheistroen et al., 1999). Die Funktion des p53 Proteins kann auch durch Bindung an virale Onkoproteine, wie HPV E6, beeinträchtigt werden (Rosenthal et al., 2003). Das mutierte p53-Protein hat eine längere Halbwertszeit und kann mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden. Verschiedene Studien untersuchten die Bedeutung der p53-Proteinüberexpression in Vulvakarzinomen, die in 46% bis 61% der Vulvakarzinome nachgewiesen wurde (Koyamatsu et al., 2003; Ngan et al., 1999). Einige Untersuchungen beobachteten eine frühe p53 Mutation in der Kanzerogenese des Vulvakarzinoms (Hantschmann et al., 2005) und eine kürzere Überlebenszeit bei erhöhtem p53 Nachweis (Kohlberger et al., 1996; Scheistroen et al., 1999). Bei anderen Studien hingegen ergab sich dafür kein signifikanter Zusammenhang (Koyamatsu et al., 2003; Lerma et al., 1999). Manche Wissenschaftler vertreten die Theorie, dass der fehlende Nachweis von p53-Protein in Tumoren eventuell mit der Präsenz von HP-Viren in Zusammenhang steht (Koyamatsu et al., 2003).

Das Ki-67 Antigen spielt vermutlich eine Rolle in der Regulation der Zellproliferation und kann immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 nachgewiesen werden. Es zeigt sich bei einigen Tumoren eine Korrelation zwischen Ki-67 Aktivität und histologischen Parametern oder der Prognose (Hantschmann et al., 2000). Beim Vulvakarzinom scheint die Verteilung der immunhistochemischen Färbung im Sinne eines Färbemusters und nicht der Anteil der gefärbten Zellen eine prognostische Relevanz zu besitzen. (Hantschmann et al., 2000; Hendricks et al., 1994; Modesitt et al., 2000)

Das Genprodukt des nm23-Gen unterdrückt die Metastasierungspotenz einer Zelle. Durch Alleldeletion kann es im späteren Verlauf einer Tumorerkrankung außer Kraft gesetzt wer-

den. Expression von nm-23 Protein ist folglich mit einem weniger aggressiven Verhalten des Tumors assoziiert. Beim Vulvakarzinom scheinen Tumoren mit Rezidiven, die vor allem in der Leiste und in anderen Organen auftreten, mit einer niedrigen Expression und einem inhomogenen Verteilungsmuster des nm23-H1 Proteins assoziiert zu sein. (Hantschmann et al., 2004)

Die Apoptose wird durch eine Vielzahl von Genen kontrolliert, so zum Beispiel durch das Gen Bcl-2, das die Apoptose verhindert, oder das Bax-Gen, das den programmierten Zelltod induziert. Proteasen der ICE-Familie, wie die ICH-1-L, spalten während der Apoptose Proteine der Zelle. Im Vulvakarzinom wird hohe Bcl-2 Expression vor allem in Karzinomen mit hohem malignen Potential bezüglich des invasiven Wachstums und Metastasierung aufgefunden. Bax hingegen scheint im Unterschied zu anderen Neoplasien, wie dem Brustkrebs, beim Vulvakarzinom keine Rolle als Prognosefaktor zu spielen. Die Expression der Protease ICH-1-L ist signifikant mit einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate assoziiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition der Apoptose im Vulvakarzinom mit einem aggressiveren Phänotyp vergesellschaftet ist. (Hantschmann und Kürzl, 2000)

Kathepsine sind ubiquitär vorhandene lysosomale Endopeptidasen. Zwei Vertreter sind Kathepsin D und das Vorläuferprotein des Kathepsin L, das Pro-Kathepsin-L. Beide haben eine verstärkte Aktivität in malignen Zellen und sind dort bei der Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beteiligt (Allgayer et al., 1997). Im Vulvakarzinom ist die Verteilung der immunhistochemischen Färbung dieser Proteasen mit dem Lymphknotenstatus und der Entwicklung von Rezidiven assoziiert. Beim Pro-Kathepsin L korreliert darüber hinaus noch der Anteil der gefärbten Zellen mit der Rezidivhäufigkeit. (Hantschmann et al. 1998)

Einen neuen Ansatz in der Klärung der Karzinogenese des Vulvakarzinoms stellt die laminin-5-gamma-2 Kette dar. Sie wird mit ähnlicher Methodik wie die bereits beschriebenen tumorassoziierten Marker immunhistochemisch dargestellt und analysiert. Dabei soll aber mit der immunhistochemischen Färbung die frühe Invasivität des Vulvakarzinoms markiert und die Tumordinvasionsfront sichtbar gemacht werden. Im nächsten Abschnitt wird auf diese laminin-5-gamma-2 Kette näher eingegangen.

1.2.3 Laminin-5-gamma-2

Laminin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das aus drei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten zusammengesetzt ist, einer schweren Kette α und zwei leichten Ketten β und γ . 11 verschiedene Untertypen sind zurzeit bekannt, die sich aus verschiedenen Kombinationen von fünf α -Ketten, drei β -Ketten und zwei γ -Ketten ergeben (Katayama et al., 2003). Eine Unterform, laminin-5 besteht aus $\alpha 3$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Ketten, die jeweils von einem anderen Gen, LAMA3 (18q 11.2), LAMB3 (1q 32) und LAMC2 (1q 25-31) genannt, codiert werden. (Lenander et al., 2003)

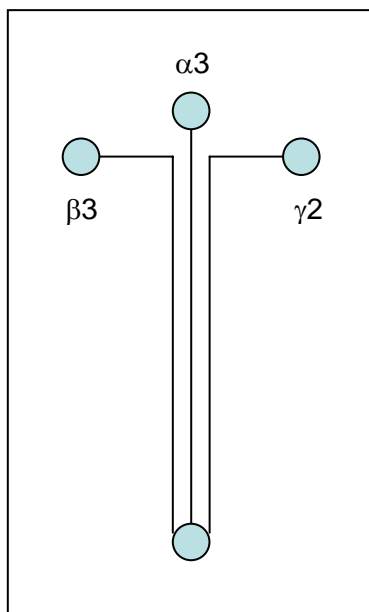


Abb. 1-7 Laminin-5.

Laminin-5 wurde morphologisch zuerst in der epithelialen Basalmembran beobachtet und spielt dort eine wichtige Rolle in der Verankerung des Epithels mit der Basalmembran (Mizushima et al., 1998). Es ist eng mit der Gewebeerneuerung, Steuerung von Zellwachstum und Differenzierung der Zellen assoziiert. So zeigten die eingewanderten Keratinozyten bei der Wundheilung eine vermehrte laminin-5 Expression (Mizushima et al., 1998). Es erfüllt aber auch andere Aufgaben, wie Zelladhäsion und Migration von Zellen unterschiedlichen Gewebes. Wird laminin auf epitheliale Zellkulturen appliziert, so wird die Streuung der Zellen deutlich gesteigert (Katoh et al., 2002).

Die Untereinheit laminin-5-gamma-2 wird von invasiv wachsenden Zellen verschiedener Gewebe im Zytoplasma exprimiert. Es markiert vor allem die Invasionsfront an der Stroma-Tumor-Grenze, wo Tumorzellen mit dem aggressivsten Potential aufzufinden sind (Yamamoto et al., 2001). Verschiedene Studien haben die Rolle von laminin-5-gamma-2 in malignen Tumoren, wie dem Adenokarzinom des Kolorektaltrakts, des Magens, des Pankreas und der Brust oder dem Plattenepithelkarzinom des Uterus, der Zervix oder des Mundes untersucht (Niki et al., 2002). Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer Überexprimierung der γ 2-Kette mit geringer Gewebsdifferenzierung, größerer Tiefeninfiltration, Auftreten von Metastasen und einer schlechteren Überlebensprognose (Giannelli et al., 2003; Katoh et al., 2002; Koshikawa et al., 1999).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Es sollten folgende Fragestellungen beurteilt werden:

bei vulvären intraepithelialen Neoplasien:

1. Sind die bekannten histologischen Parameter mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert?
2. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit den bekannten histologischen Parametern assoziiert?
3. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert?
4. Kann mit der immunhistologischen Anfärbung der laminin-5-gamma-2 Kette die frühe Invasivität nachgewiesen werden?

bei Vulvakarzinomen:

1. Sind die bekannten histologischen Parameter mit dem Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Rezidiven und dem Gesamtüberleben assoziiert?
2. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit den bekannten histologischen Parametern assoziiert?
3. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit dem Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Rezidiven und dem Gesamtüberleben assoziiert?

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Die Untersuchung schloss zwei unterschiedliche Patientinnenkollektive ein.

Die eine Gruppe setzte sich aus Patientinnen zusammen, die zwischen 1987 und 2002 in der I. Universitätsfrauenklinik (I. UFK) wegen eines Plattenepithelkarzinoms der Vulva operiert wurden. Dabei wurde auf eine bereits bestehende Datenbank von 1987 bis 1994 zurückgegriffen und diese mit neuen Krankheitsfällen bis 2002 ergänzt.

Die andere Gruppe waren Frauen, die im Zeitraum von 1991 bis 2002 in der I. UFK wegen einer vulvären intraepithelialen Neoplasie Grad III behandelt wurden.

2.1.1 Erhebung klinischer und makropathologischer Befunde

Aus den archivierten Krankenblättern wurden die klinischen und makropathologischen Befunde erfasst und in zwei Datenbanken, für jeweils ein Patientenkollektiv, festgehalten.

Evaluiert wurde zum Zeitpunkt der Behandlungsmaßnahme:

Bei Patientinnen mit vulvärer intraepithelialer Neoplasie:

- Alter bei Diagnosestellung
- Symptome
- VIN-Lokalisation
- Behandlung

Bei Patientinnen mit Vulvakarzinom:

- Alter bei Diagnosestellung
- Menarche und Menopause
- Parität
- Komorbidität
- Symptome
- Tumorlokalisation
- Untersuchungsbefund der Vulva
- präoperative Histologie
- Lymphknotenstatus klinisch
- Behandlung lokal und regional

2.1.2 Follow-up

Um Auskunft über das Auftreten von Rezidiven und die Überlebenszeit zu erhalten, wurde ein Follow-up bis zum Tode oder bis zum Ende der Studie im Januar 2003 bei den Patientinnen durchgeführt.

Von den Patientinnen, die regelmäßig zur Nachsorge in die I. UFK kamen, wurden die Follow-up Daten aus den Krankenjournalen entnommen. Um die Daten der anderen Frauen zu erhalten, wurden zunächst die Hausärzte telefonisch oder schriftlich kontaktiert und um Auskunft gebeten. Konnten auf diesem Weg die entsprechenden Daten nicht erhoben werden, so wurde mit den Patientinnen direkt Kontakt aufgenommen und diese gebeten, über ihren weiteren Krankheitsverlauf zu berichten.

Informationen über Patientinnen, die verzogen oder verstorben waren, wurden von den Einwohnermeldeämtern eingeholt.

Beim rezidivfreien Überleben wurde der Beobachtungszeitraum vom Erstdatum der Diagnosestellung bis zum Auftreten von Rezidiven oder bis zum letzten Kontakt zu Patientinnen ohne Rezidive berechnet. Dabei wurden lokale, regionale und distante Tumoren als Rezidiv erfasst.

Für das Gesamtüberleben wurde das Erstdatum der Diagnosestellung als Beobachtungsbeginn definiert, das Beobachtungsende war entweder der letzte Kontakt zu den Patientinnen oder der Todeszeitpunkt der Patientinnen.

2.2 **Aufbereitung der Vulvapräparate**

Für die histologische und immunhistologische Untersuchung wurden Operationspräparate der Vulva aufgespannt, für mindestens 24 Stunden in 4% gepuffertem Formalin eingelegt, in standardisierter Weise zugeschnitten und danach in Paraffin eingebettet.

Für die Histologie wurden Paraffinschnitte von allen Präparatblöcken angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

An Hand dieser HE-Schnitte wurde für die Immunhistochemie der am besten geeignete Präparatblock für jede Patientin herausgesucht. Dieser sollte gut erhalten sein und einen ausreichend großen Tumoranteil mit einer guten Tumor-Stroma-Grenze aufweisen. Aus diesem Paraffinblock wurden 2-3 µm dünne Schnitte hergestellt und auf Super Frost Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland), welche eine spezielle Beschichtung für die Immunhistochemie besitzen, aufgezogen.

2.3 **Histologie**

Der histologische Befund wurde von einem erfahrenen Untersucher, dem die immunhistologischen Färbeergebnisse unbekannt waren, anhand der HE-Schnitte unter dem Lichtmikroskop erhoben.

2.3.1 **Histologische Beurteilung der vulvären intraepithelialen Neoplasien**

Folgende histologische Kriterien wurden bei den vulvären intraepithelialen Neoplasien erfasst:

VIN - Typ	kondylomatös basaloid Mischtyp differenziert
Entzündung	keine wenig mäßig stark sehr stark

Mitosen	wenig	0-3/10 hpf
	mäßig	4-5/10 hpf
	viele	>5/10 hpf

Mitosenzahl pro 10 Gesichtsfelder bei 400 facher Vergrößerung (high power fields)

Entfernung in sano	in sano
	non in sano

2.3.2 Histologische Beurteilung der Vulvakarzinome

Der histologische Befund des Vulvakarzinoms erfasste folgende Daten:

Tumortyp	verhornend
	nicht verhornend
	basaloid
	kondylomatös
Epithelveränderungen am Karzinomrand	keine
	VIN III vom undifferenzierten Typ
	VIN III vom differenzierten Typ
	Lichen sclerosus
	squamöse Hyperplasie
Infiltrationstiefe	in mm

maximale Infiltrationstiefe in mm, gemessen von der Basalmembran der oberflächlichsten epidermalen Papille zum tiefsten Punkt der Infiltration (Wilkinson, 2000)

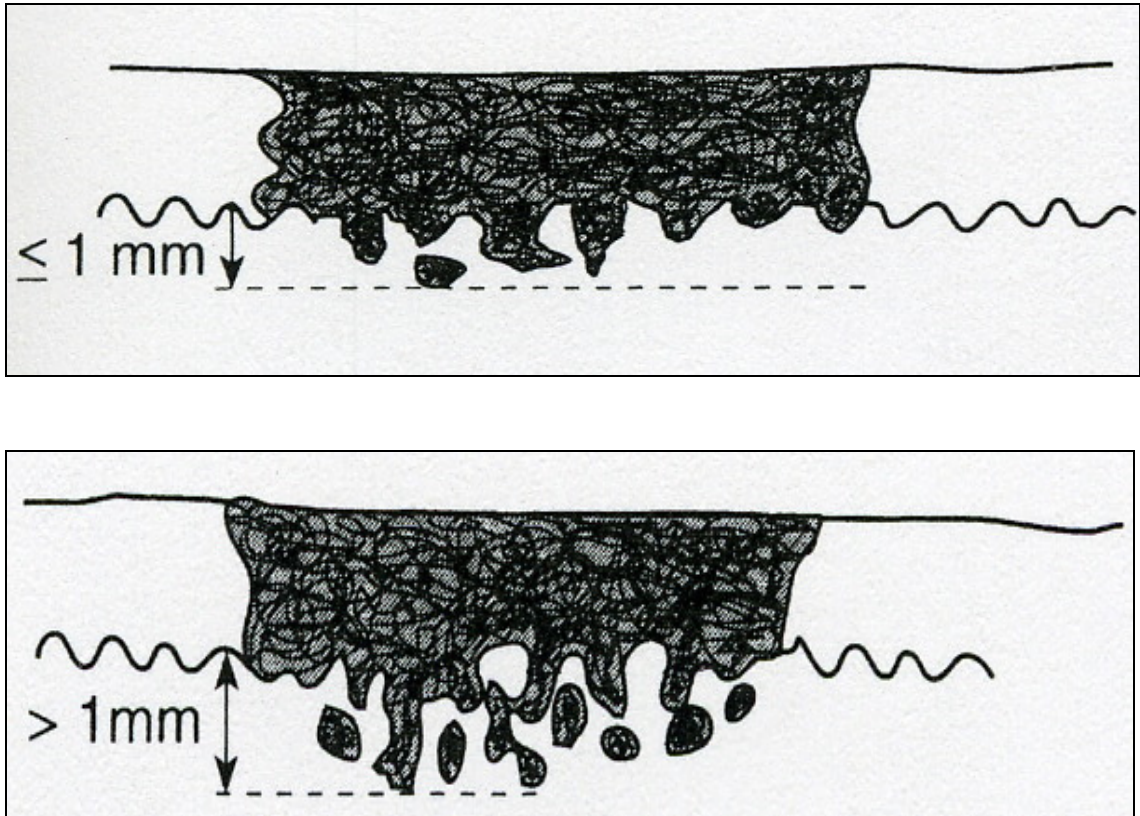


Abb. 2-1 Die Messmethode der Infiltrationstiefe des Plattenepithelkarzinoms der Vulva entsprechend der Anweisung im TNM-Atlas (Wittekind, Klimpfinger und Sobin, 2005).

Entzündung	keine	
	wenig	
	mäßig	
	stark	
	sehr stark	
Mitosen	wenig	0-3/10 hpf
	mäßig	4-5/10 hpf
	viele	>5/10 hpf

Mitosenzahl pro 10 Gesichtsfelder bei 400 facher Vergrößerung (high power fields)

Nekrosen	keine
	mittel
	ausgedehnt

Grading	G1 = hochdifferenziert G2 = mäßig differenziert G3 = gering differenziert
----------------	---

Lymphangiosis carcinomatosa	keine vorhanden
------------------------------------	--------------------

Lymphangiosis carcinomatosa (Tumorzellen im Lumen eines Erythrozyten freien Gefäßes)

Hämangiosis carcinomatosa	keine vorhanden
----------------------------------	--------------------

Hämangiosis carcinomatosa (Tumorzellen im Lumen eines Erythrozyten enthaltenden Gefäßes)

Lymphknotenmetastasen	ipsilateral bilateral
------------------------------	--------------------------

lokales Tumorstadium	pT- Klassifikation
-----------------------------	--------------------

Entfernung in sano	in sano non in sano
---------------------------	------------------------

2.4 Immunhistologie

2.4.1 Methodik der Immunhistologie

Die Immunhistologie dient der Darstellung antigener Strukturen, wie Peptiden und Proteinen auf oder in Zellen bzw. Geweben. Dazu stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, die alle auf demselben Prinzip beruhen. Ein spezifischer Antikörper bindet an das darzustellende Antigen und wird anschließend sichtbar gemacht. Dafür ist an den Antikörper selbst eine fluoreszierende Substanz bzw. ein Markerenzym gebunden (direkte Methode) oder der Antikörper wird in einem zweiten Reaktionsschritt mit einem weiteren Antikörper, der mit einem Fluorochrom oder Markerenzym konjugiert ist, nachgewiesen (indirekte Methode). Bei der indirekten Methode können verschiedene Verfahren, wie ein dritter Antikörper, die Nachweisempfindlichkeit weiter steigern.

Für die Darstellung der laminin-5-gamma-2 Kette wurde die indirekte Methode verwendet. Dabei kamen die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) (siehe Abb. 2-2), die eine Dreistufenfärbung ist, und 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen zum Einsatz.

Im Einzelnen läuft die Färbung nach folgendem Prinzip ab: als erstes wird ein monoklonaler, wie in unserem Fall, oder polyklonaler unkonjugierter Primärantikörper zur Detektion des Antigens auf die Probe gebracht. Im zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper anderer Tierspezies im Überschuss dazugegeben, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. An diesem Sekundärantikörper ist das Molekül Biotin kovalent gekoppelt. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, das als Verbindung zum nun im dritten Schritt zugegebenen Avidin-Biotin-Komplex dient. Das Glykoprotein Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Biotin und bindet mit einer hohen Affinität an dieses. An den Avidin-Biotin-Komplex ist über Biotin eine Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase fungiert als Enzym und überträgt von DAB Elektronen auf das zugegebene Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das so zu Wasser reduziert wird. DAB fällt zu einem unlöslichen, bräunlichen Produkt aus.

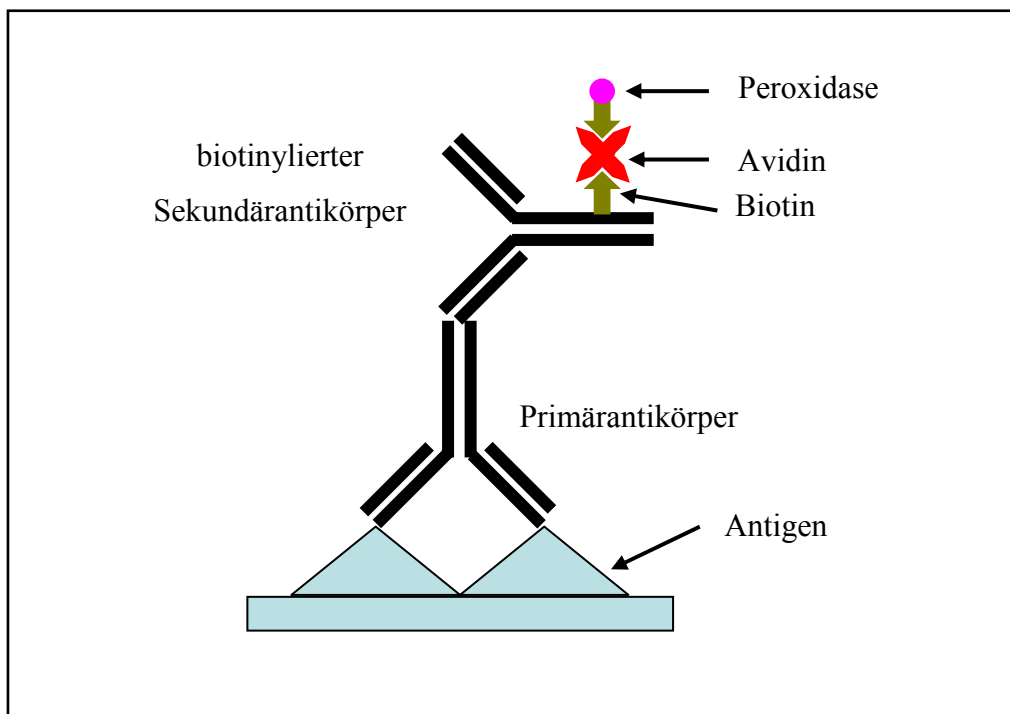


Abb. 2-2 Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Die Labormethode im Einzelnen (siehe Tab. 2-1) (http://pri.dakocytomation.com/laminin-5_brochure.pdf; www.dakocytomation.dk/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=106496001):

In jeder Färbeserie wurde eine positive Kontrolle mitgeführt. Es handelte sich dabei um ein invasives Zervixkarzinom, das aus instituteigenem Material stammte, so dass die gleichen Bedingungen während der Fixierung und Einbettung gewährleistet waren.

Für die Vorbehandlung und Färbung der Präparate wurde das etablierte Protokoll dieses Antikörpers verwendet. Verdünnung, Verdünnungsmedium, Inkubationszeit und -temperatur wurden durch vorherige Probefärbungen so angepasst, dass die bestmöglichen Färbeergebnisse unter den Laborbedingungen entstanden.

Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte zunächst 10 Minuten im Intermedium Xylol depa-
raffiniert, da Paraffin in Alkohol nicht löslich ist. Danach wurden sie schrittweise in ab-
steigender Alkoholreihe jeweils zweimal von 100% über 96% zu 70%igem Ethylalkohol
bis zum destillierten Wasser hydriert. Anschließend wurden die Schnitte in einem handels-
üblichen Dampfdruckkochtopf in 1 Liter 10 mmol/l Trispuffer (Sigma, Steinheim,
Deutschland) und 1 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth, Karlsruhe,
Deutschland), pH 9, für 5 Minuten sprudelnd gekocht. Diese hitzeinduzierte Antigende-
maskierung bewirkte eine Freilegung der antigenen Determinante, die durch fixationsbe-
dingte Quervernetzungen unzugänglich geworden war, und damit deren Erkennungsmög-
lichkeit durch den im weiteren Färbevorgang zugegebenen Antikörper.

Nach Öffnen des Topfes ließ man langsam 1 Minute kaltes Leitungswasser zur Abkühlung
zulaufen. Darauf folgte eine zweimalige Spülung der Objektträger in Aqua dest.

Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase, um später deren
Mitreaktion mit DAB und damit entstehende falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Da-
für wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung
(H_2O_2), hergestellt aus 30% H_2O_2 (Apotheke, Klinikum Innenstadt) und Methanol (Merck,
Darmstadt, Deutschland), für 20 Minuten gestellt und anschließend zweimal für 2 Minuten
in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), zusammengesetzt aus Natriumchlorid (Flu-
ka, Buchs, Schweiz), di-Natriumhydrogenphosphat (Merck) und Kaliumdihydrogen-
phosphat (Merck), pH 7,4, gewaschen. Die Restflüssigkeit wurde mit Zellstoff abgetupft
und die Objektträger in eine feuchte Färbekammer gelegt.

Um unspezifisch Hintergrundfärbung zu verhindern wurden ein mit 1,5:100 in PBS (Bio-
chrom AG, Berlin, Deutschland) verdünntes Normalserum (aus dem Vectastain Elite ABC

Kit / Mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, USA) (Blockierserum) mit Pipette aufgetragen und die Präparate für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Normalserum diente zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine, so dass der im nachfolgenden zugegebene Primärantikörper möglichst spezifische Bindungen mit dem nachzuweisenden Antigen eingehen konnte.

Nach Abschütten des Normalserums wurde die restliche Lösung vorsichtig mit Zellstoff vom Objektträger gewischt, um eine Weiterverdünnung des Primärantikörpers zu verhindern. Der mit 1:25 in einem Antikörper-Verdünnungsmedium mit Hintergrund reduzierenden Bestandteilen (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verdünnte Primärantikörper (laminin-5-gamma-2 Antikörper, DakoCytomation) wurde mit einer Pipette aufgetragen und in einer feuchten Kammer für 16 Stunden über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überständige Antikörper mit PBS zweimal 2 Minuten abgewaschen.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die wieder mit Zellstoff getrockneten Objektträger mit einem mit Biotin konjugierten und 1:200 mit Verdünnungsmedium (DakoCytomation) verdünnten Sekundärantikörper (aus o.g. ABC-Kit) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Währenddessen wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (aus o.g. ABC-Kit) gemäß der Gebrauchsanweisung angesetzt. Nachdem die Schnitte zweimal 2 Minuten in PBS gewaschen wurden, wurden sie für weitere 30 Minuten in der feuchten Kammer mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex inkubiert.

Anschließend erfolgte wieder zweimaliges Waschen in PBS für 2 Minuten.

Zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper wurde Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (Dyna Chrome DAB, Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) verwendet. Dieses wurde nach Gebrauchsanweisung in einem Puffer (aus o.g. Dyna Chrome DAB) gelöst, um bei der Reaktion den pH-Wert zu stabilisieren, und 12 Minuten unter genauer Beobachtung auf den Schnitten belassen.

Nach zweimaligen Waschen für 2 Minuten in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung für 5 Minuten in saurer Hämalaunlösung nach P. Mayer (Apotheke Klinikum Innenstadt) und anschließender Wässerung in lauwarmem Leitungswasser für 10 Minuten. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration von 70% über 96% zu zweimal 100%igem Ethanol geschwenkt und danach für 5 Minuten in

Xylol belassen. Der letzte Schritt war die Eindeckelung der Präparate mit einem Tropfen Vitro-Clud (R. Langenbrinck) und einem Deckglas.

Tab. 2-1 Protokoll für immunhistologische Färbung.

1	Paraffinschnitte auf Objektträger; positive Kontrolle: Zervixkarzinom
2	Deparaffinieren in Xylol (10 min) und absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.
3	5 min kochen in 10 mmol/l Trispuffer und 1 mmol/l EDTA
4	1 min abkühlen mit kaltem Leitungswasser; 2x spülen in Aqua dest.
5	Blockierung der endogenen Peroxidase in 3%iger H ₂ O ₂ -Lösung für 20 min
6	2x2 min waschen in PBS-Puffer
7	Inkubation mit Blockierserum für 20 min in der feuchten Kammer
8	Inkubation mit Primärantikörper für 16 h in der feuchten Kammer im Kühlschrank
9	2x2 min waschen in PBS-Puffer
10	Inkubation mit Sekundärantikörper für 30 min in der feuchten Kammer
11	2x2 min waschen in PBS-Puffer
12	Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex für 30 min in der feuchten Kammer
13	2x2 min waschen in PBS-Puffer
14	Färbung mit DAB für 12 min
15	2x2 min waschen in Aqua dest.
16	Gegenfärbung mit Hämalaunlösung für 5 min
17	10 min wässern in Leitungswasser
18	aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (5 min)
19	Eindeckeln

2.4.2 Auswertung der immunhistologischen Präparate

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte von zwei Untersuchern unabhängig voneinander. Beiden waren die dazugehörigen klinischen und pathologischen Befunde unbekannt.

Die Objektträger wurden mit einem Standardlichtmikroskop betrachtet. Zunächst wurde das Präparat bei 50-facher Vergrößerung in Übersicht qualitativ beurteilt und unbrauchbare

Exemplare aufgrund von Materialschäden, die beim immunhistochemischen Färbedurchgang entstanden waren, verworfen und die Färbung wiederholt.

Bei der Auswertung wurde der gefärbte Anteil des Tumorgewebes in Prozent geschätzt. Der verwendete monoklonale Maus-Antikörper war im Zytoplasma derjenigen Tumorzellen, die die laminin-5-gamma-2 Kette exprimierten, aufzufinden.

Aus Gründen der Auswertbarkeit und der besseren Übersicht wurde der Anteil des gefärbten Tumorgewebes in vier Kategorien eingeteilt. Das folgende Schema wurde sowohl für die Auswertung der VIN III Präparate als auch der Vulvakarzinome angewendet (siehe Tab. 2-2).

Tab. 2-2 Auswertungsschema der immunhistologischen Färbung.

Wert	Anteil des gefärbten Tumorgewebes
0	negativ
1	fokal positiv
2	kleiner gleich 50% positiv
3	mehr als 50% positiv

Um mögliche Fehler zu überprüfen, erfolgte in der Auswertung eines Untersuchers eine stichprobenartige Wiederholung der Beurteilung zu einem späteren Zeitpunkt. Ergaben sich Differenzen in der Beurteilung der beiden Untersucher, so wurden die fraglichen Präparate von beiden nochmals gemeinsam angeschaut und ausgewertet.

2.5 Statistik

Die erhobenen klinischen und pathologisch-makroskopischen Befunde wurden in zwei Datenbanken, für jeweils ein Patientenkollektiv, die in Access (Microsoft, Redmond, USA) erstellt wurden, festgehalten und ausgewertet.

Die statistische Auswertung der histologischen und immunhistologischen Parameter erfolgte mit dem χ^2 -Test. Waren die Voraussetzungen für den χ^2 -Test nicht erfüllt ($n \geq 50$ und $e_i \geq 5$), so wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Alle statistischen Analysen waren zweiseitig. Als signifikant wurde ein Unterschied ab $p < 0,05$ bewertet.

Das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben wurden nach der Methode von Kaplan-Meier ausgewertet. Patientinnen, die ab einem bestimmten Datum nicht mehr beobachtet werden konnten (lost to Follow-up), wurden zu diesem Zeitpunkt zensiert.

Für die Auswertung des rezidivfreien Intervalls waren Patientinnen, die nach Behandlung nicht tumorfrei waren nicht geeignet. Sie wurden aus der Auswertung herausgenommen.

Patientinnen ohne Rezidive, die tumorunabhängig verstorben waren, wurden als zensiert betrachtet.

Für das Gesamtüberleben wurden Todesfälle, deren Todesursachen nicht Vulvakarzinom abhängig waren, als zensiert betrachtet. Patientinnen mit unklarer Todesursache wurden einmal als zensiert und einmal als nicht zensiert betrachtet. Ergaben sich hierbei Unterschiede sind diese im Ergebnisteil gesondert besprochen.

Die statistische Signifikanz der Überlebenskurven wurde mit dem Log-Rank Test errechnet.

Bei Mittelwerten wurde die Standardabweichung (\pm) immer in Klammern zusätzlich angegeben.

Die Prozentangaben wurden gerundet, weshalb das Addieren der Zahlen manchmal von 100% abweicht.

3 Ergebnisse

3.1 Vulväre intraepitheliale Neoplasie

3.1.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv bestand aus 88 Frauen, die im Zeitraum von 1991 bis 2002 an der I. Universitätsfrauenklinik (I. UFK) wegen einer vulvären intraepithelialen Neoplasie therapiert wurden: 73 Patientinnen wurden primär in der I. UFK behandelt, 15 Patientinnen kamen erst mit einem Rezidiv zur Therapie.

Zusätzlich hatten von den 73 Patientinnen der Primärtherapie 13 ein Rezidiv, somit entwickelten insgesamt 28 Frauen Rezidive.

Aus technischen Gründen war bei 4 Rezidivfällen eine immunhistologische Färbung nicht möglich, so dass insgesamt nur 24 (15 + 9) Rezidive immunhistologisch ausgewertet werden konnten.

Bei vier der 73 primär behandelten Frauen konnten keine weiteren Daten mehr erhoben werden. Sie wurden bei der klinischen, histologischen und immunhistologischen Auswertung mit einbezogen, nicht jedoch bei der Berechnung des rezidivfreien Intervalls.

3.1.2 Klinik und makropathologische Befunde

Alter:

Von den 88 Patientinnen, die wegen einer vulvären intraepithelialen Neoplasie behandelt wurden, betrug das mittlere Erkrankungsalter 51 Jahre (± 15), die jüngste Patientin war 19 Jahre, die älteste 92 Jahre alt (siehe Abb. 3-1). 67% erkrankten zwischen dem 30. und 59. Lebensjahr.

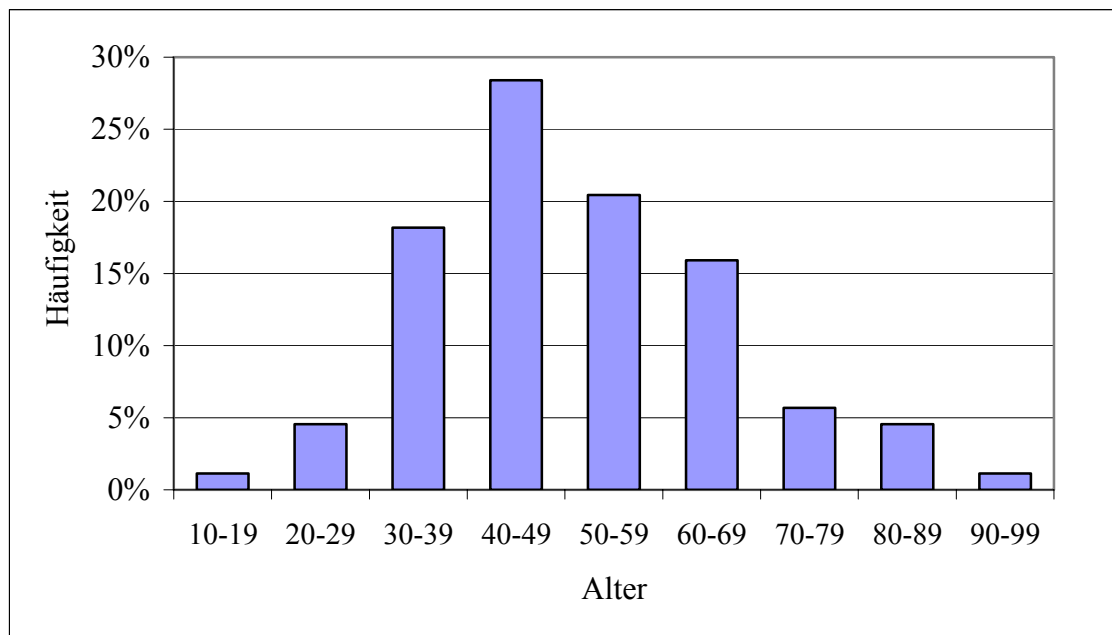


Abb. 3-1 Altersverteilung der VIN-Patientinnen bei Diagnosestellung ($n_{\text{Patientinnen}} = 88$).

Symptome:

43 Patientinnen waren symptomlos. Die restlichen 45 Frauen gaben an, Symptome wie Pruritus vulvae, Fremdkörpergefühl, Brennen, Schmerzen und Blutungen gehabt zu haben. Die Verteilung ist in Abb. 3-2 dargestellt.

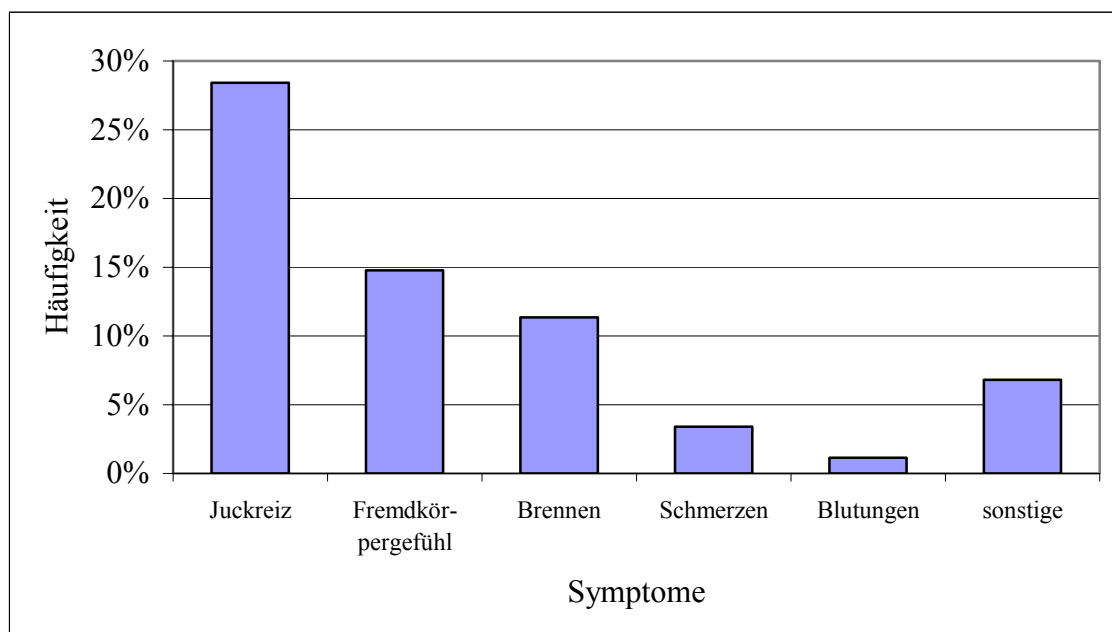


Abb. 3-2 Symptome bei VIN (Mehrfachnennung) ($n_{\text{Patientinnen}} = 45$).

VIN-Lokalisation:

Zur Lokalisation lagen bei 86 der 88 Patientinnen Angaben vor.

Die Verteilung ist in Abb. 3-3 enthalten. Am häufigsten waren die Labien betroffen, wesentlich seltener trat die vulväre intraepitheliale Neoplasie im Bereich der vorderen Kommissur und der Klitoris auf.

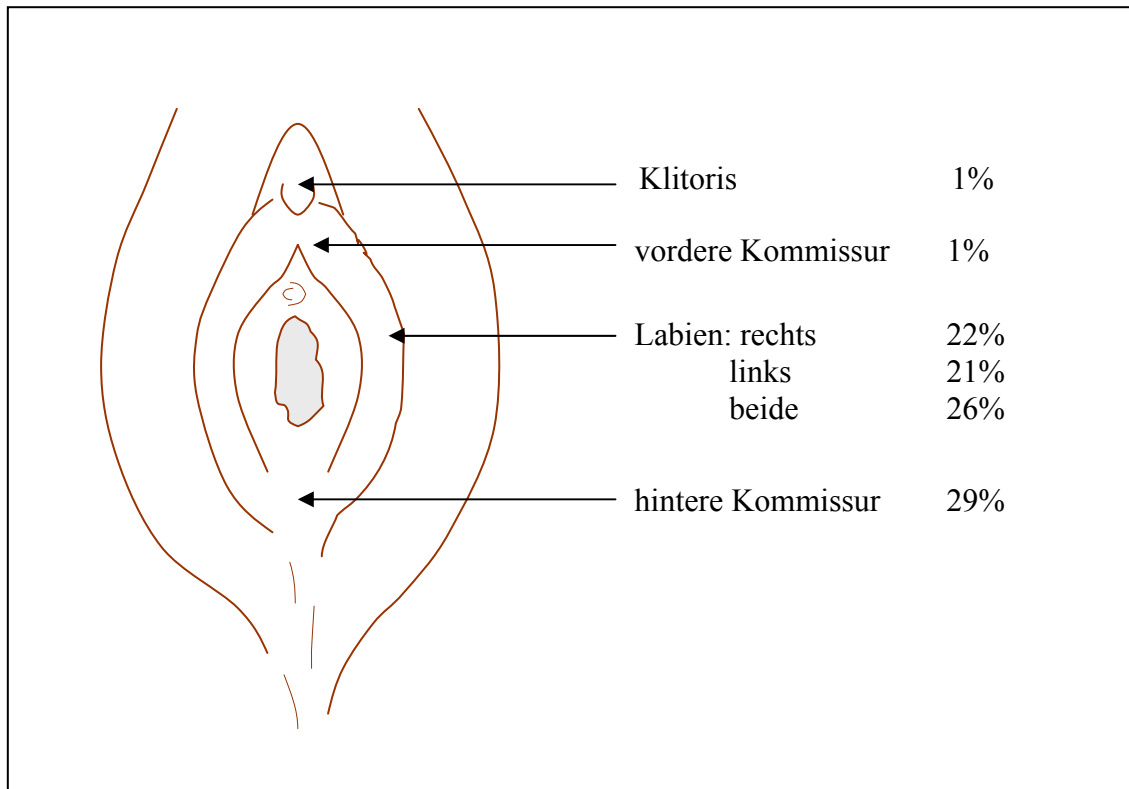


Abb. 3-3 Lokalisation der VIN ($n_{\text{Patientinnen}} = 86$).

Behandlung:

Die vulväre intraepitheliale Neoplasie wurde durch lokale Exzision, Laser oder einer Kombinationsbehandlung mit lokaler Exzision und Laser therapiert (siehe Tab. 3-1).

Tab. 3-1 Ersttherapie der VIN ($n_{\text{Patientinnen}} = 88$).

Ersttherapie	Anzahl	Prozent
lokale Exzision	77	88%
Laser	4	5%
Exzision + Laser	7	8%

3.1.3 Follow-up

Das Follow-up wurde bis mindestens Januar 2003 durchgeführt.

Der Nachbeobachtungszeitraum betrug im Durchschnitt 70 Monate (range: 2 Monate bis 276 Monate).

Rezidive:

Bei 28 Patientinnen (33%) entwickelte sich ein Rezidiv: 27 davon waren wieder vulväre intraepitheliale Neoplasien III, eines jetzt eine invasive Neoplasie, d.h. ein Vulvakarzinom. Dieses wurde 9 Monate nach der vulvären intraepithelialen Neoplasie im Stadium pT1a diagnostiziert.

Bei zwei weiteren Patientinnen war das zweite Rezidiv ein Vulvakarzinom. Das eine (Stadium pT1b, pN1) trat 6 Jahre nach dem ersten Rezidiv und das andere (Stadium pT1a) 2 Jahre nach dem ersten Rezidiv auf.

Das mittlere rezidivfreie Intervall der Patientinnen belief sich auf 53 Monate. Die kürzeste Zeitspanne betrug 5 Monate, die längste 244 Monate. Ein Drittel der Rezidive war innerhalb von zwei Jahren aufgetreten.

Überleben:

Insgesamt verstarben 9 Patientinnen, eine an dem invasiven Rezidiv, dass wie oben beschrieben im Stadium pT1b, pN1 diagnostiziert wurde. Die übrigen verstarben unabhängig von der VIN Erkrankung.

3.1.4 Histologie

3.1.4.1 Ergebnisse der histologischen Beurteilung

Die 73 Präparate, die nach Ersttherapie gewonnen wurden, sind getrennt von den 24 vorhandenen Rezidivpräparaten ausgewertet worden.

Ersttherapie:

In Tab. 3-2 sind der histologische VIN-Typ, die Entzündungsreaktionen, die Mitosenzahl und Entfernung der VIN in sano aufgelistet.

Tab. 3-2 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der VIN ($n_{VIN} = 73$).

	Anzahl
VIN - Typ	
kondylomatös	22
basaloid	25
Mischtyp	23
differenziert	3
Entzündung	
keine	0
wenig	28
mäßig	32
stark	10
sehr stark	3
Mitosen	
wenig	31
mäßig	28
viele	14
Entfernung in sano	
in sano	41
non in sano	32

Das mittlere Alter der Patientinnen bezogen auf die verschiedenen VIN-Typen ist in Tab. 3-3 dargestellt.

Tab. 3-3 Alter bezogen auf verschiedenen VIN-Typen.

VIN-Typ	Alter	\pm
kondylomatös	49	11
basaloid	58	19
Mischtyp	46	14
differenziert	66	6

Rezidive:

Die Verteilung der histologischen Ergebnisse von VIN-Rezidiven ist in Tab. 3-4 enthalten.

Tab. 3-4 Ergebnisse der histologischen Beurteilung der VIN-Rezidive ($n_{\text{VIN}} = 24$).

	Anzahl
VIN - Typ	
kondylomatös	10
basaloid	7
Mischtyp	6
differenziert	1
Entzündung	
keine	0
wenig	6
mäßig	11
stark	7
sehr stark	0
Mitosen	
wenig	6
mäßig	17
viele	1
Entfernung in sano	
in sano	15
non in sano	9

3.1.4.2 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern

Histologische Parameter, wie der VIN-Typ, die Entzündungsreaktion des Stromas, die Anzahl der Mitosen und die Entfernung in sano bzw. non in sano zeigten keine Assoziation zum Auftreten von Rezidiven (siehe Tab. 3-5).

Tab. 3-5 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern ($n_{VIN} = 69$).**n.s. = nicht signifikant**

	Anzahl	Rezidive	X ² -Test
VIN - Typ			
kondylomatös	20	4	n.s.
basaloid	25	3	
Mischtyp	21	5	
differenziert	3	1	
Entzündung			
keine	0	0	n.s.
wenig	25	4	
mäßig	31	7	
stark	10	2	
sehr stark	3	0	
Mitosen			
wenig	31	7	n.s.
mäßig	25	5	
viele	13	1	
Entfernung in sano			
in sano	39	4	n.s.
non in sano	30	9	

Beim rezidivfreien Intervall fanden sich statistisch signifikante Unterschiede nur bei der VIN-Entfernung in sano bzw. non in sano. Dabei nahm das rezidivfreie Intervall bei vulvären intraepithelialen Neoplasien, die nicht im Gesunden entfernt worden sind, ab ($p = 0,004$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-6).

Tab. 3-6 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der VIN-Entfernung in sano ($n_{VIN} = 69$).

Entfernung in sano	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
in sano	39	134 (± 9)
non in sano	30	80 (± 13)

3.1.5 Immunhistologie

3.1.5.1 Färbeergergebnisse von laminin-5-gamma-2

Eine Detektion der laminin-5-gamma-2 Kette erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an das Antigen band. Dieser wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode und 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid als Chromogen sichtbar gemacht. Die positive Färbung befand sich im Zytoplasma.

51 Präparate der Primärbehandlung waren komplett negativ, 22 waren positiv. Die Verteilung ist in Tab. 3-7 aufgelistet.

Tab. 3-7 Färbeergergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN ($n_{\text{VIN}} = 73$).

Färbeergergebnis	Anzahl	Prozent
negativ	51	70%
fokal positiv	15	21%
$\leq 50\%$ positiv	6	8%
$> 50\%$ positiv	1	1%

Von 24 Rezidivpräparaten waren 20 komplett negativ, vier waren positiv. Die Verteilung ist in Tab. 3-8 dargestellt.

Tab. 3-8 Färbeergergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN-Rezidiven ($n_{\text{VIN}} = 24$).

Färbeergergebnis	Anzahl	Prozent
negativ	20	83%
fokal positiv	3	13%
$\leq 50\%$ positiv	1	4%
$> 50\%$ positiv	0	0%

In Abb. 3-4 und Abb. 3-5 sind Beispiele positiver Färbeergergebnisse fotografiert.

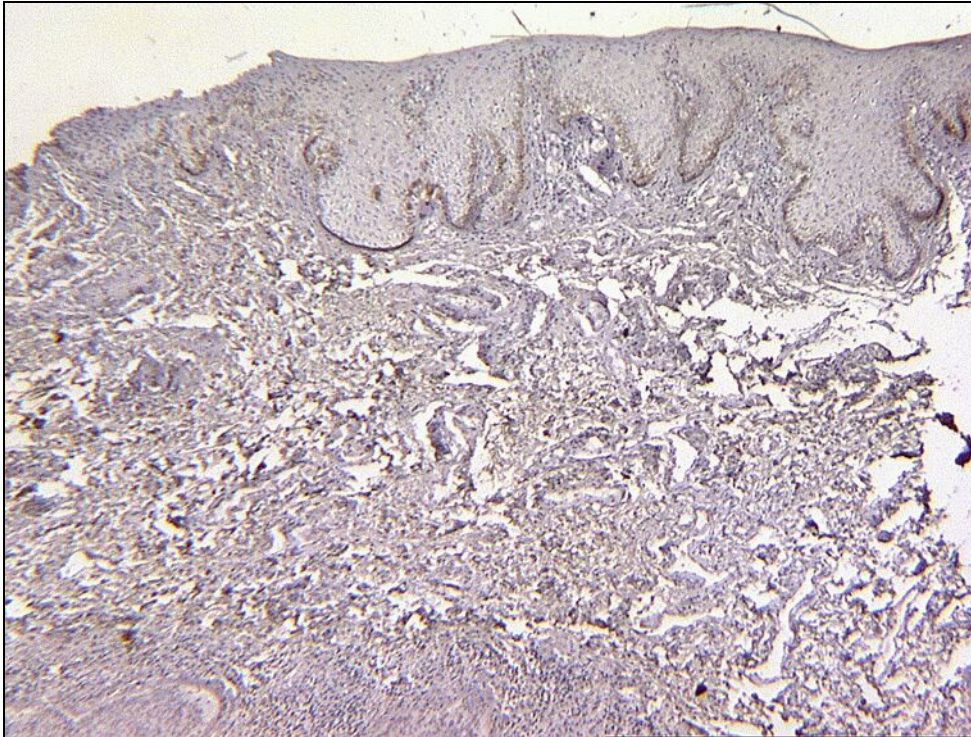


Abb. 3-4 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung in VIN:
Akkumulation der laminin-5-gamma-2 Kette an der Stroma-Tumor-Grenze.

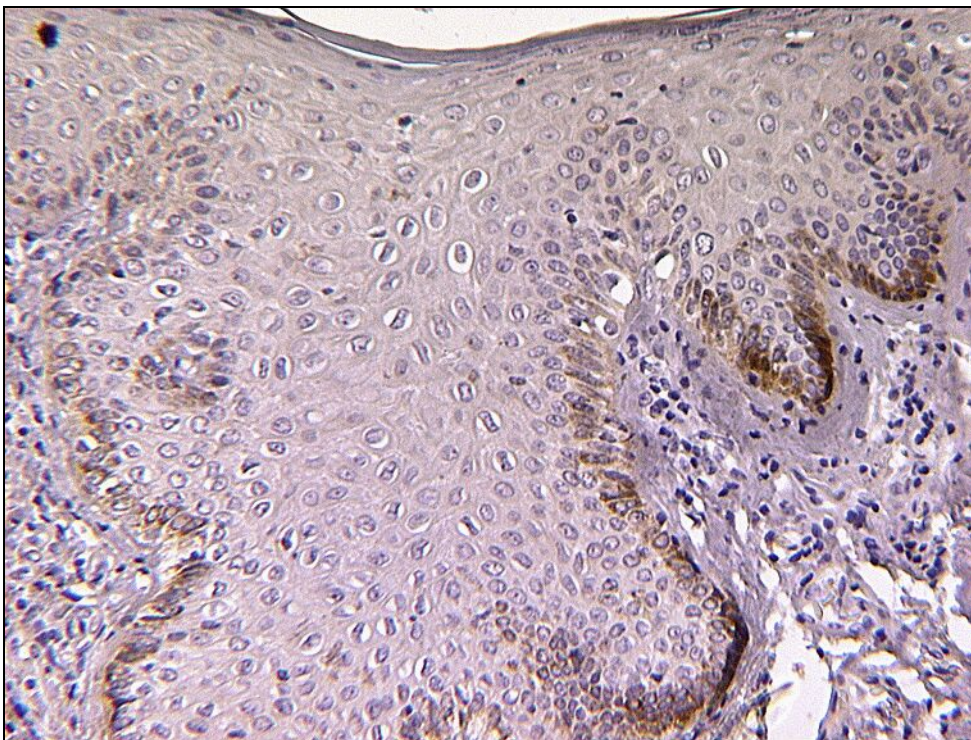


Abb. 3-5 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung in VIN:
positive Färbung im Zytoplasma der Neoplasiezellen.

3.1.5.2 Histologische Parameter in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen

Eine Assoziation der histologischen Parameter, wie dem VIN-Typ, der Entzündungsreaktion des Stromas und der Mitosenzahl mit den Färbeergebnissen konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 3-9).

Tab. 3-9 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei VIN in Abhängigkeit von den histologischen Parametern ($n_{VIN} = 73$).

	Färbung				
	keine	fokal	≤50%	>50%	X²-Test
VIN-Typ					
kondylomatös	18	4	0	0	n.s.
basaloid	16	6	3	0	
Mischtyp	16	3	3	1	
differenziert	1	2	0	0	
Entzündung					
keine	0	0	0	0	n.s.
wenig	19	7	2	0	
mäßig	23	5	3	1	
stark	6	3	1	0	
sehr stark	3	0	0	0	
Mitosen					
wenig	22	7	2	0	n.s.
mäßig	21	3	3	1	
viele	8	5	1	0	
sehr viele	0	0	0	0	

3.1.5.3 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen

Für die Färbeergebnisse ließ sich auch kein statistischer Zusammenhang mit der Entwicklung von Rezidiven herstellen (siehe Tab. 3-10).

Tab. 3-10 Färbeergebnisse der VIN in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall ($n_{VIN} = 69$).

Rezidiv	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	≤50%	>50%	
kein	38	12	4	1	n.s.
vorhanden	9	2	2	0	

Es ergab sich auch kein Unterschied im rezidivfreien Intervall in Abhängigkeit vom Färbeergebnis (116 Monate bei negativen Färbeergebnis versus 111 bei positivem; $p = 0,69$, Log-Rank Test).

3.2 Vulvakarzinom

3.2.1 Patientinnenkollektiv

In die vorliegende Untersuchung wurden insgesamt 155 Patientinnen aufgenommen, die zwischen 1987 und 2002 in der I. UFK wegen eines Plattenepithelkarzinoms der Vulva operiert wurden.

Für die Auswertung des Gesamtüberleben stehen 146 Patientinnen zu Verfügung, da bei 9 Frauen keine weiteren Daten mehr nach Ersttherapie erhoben werden konnten.

Diese 146 Patientinnen reduzierten sich für die Besprechung des rezidivfreien Intervalls auf 133 Patientinnen, da 13 Frauen nach der Behandlung nicht tumorfrei waren und somit wegen Persistenz ausgeschlossen wurden.

3.2.2 Klinik und makropathologische Befunde

Alter:

Bei den 155 Patientinnen, die in der I. UFK wegen einem Plattenepithelkarzinom der Vulva behandelt wurden, betrug das mittlere Erkrankungsalter 67 Jahre (± 14). Die jüngste Patientin war 33 Jahre und die älteste 90 Jahre alt bei Diagnosestellung (siehe Abb. 3-6).

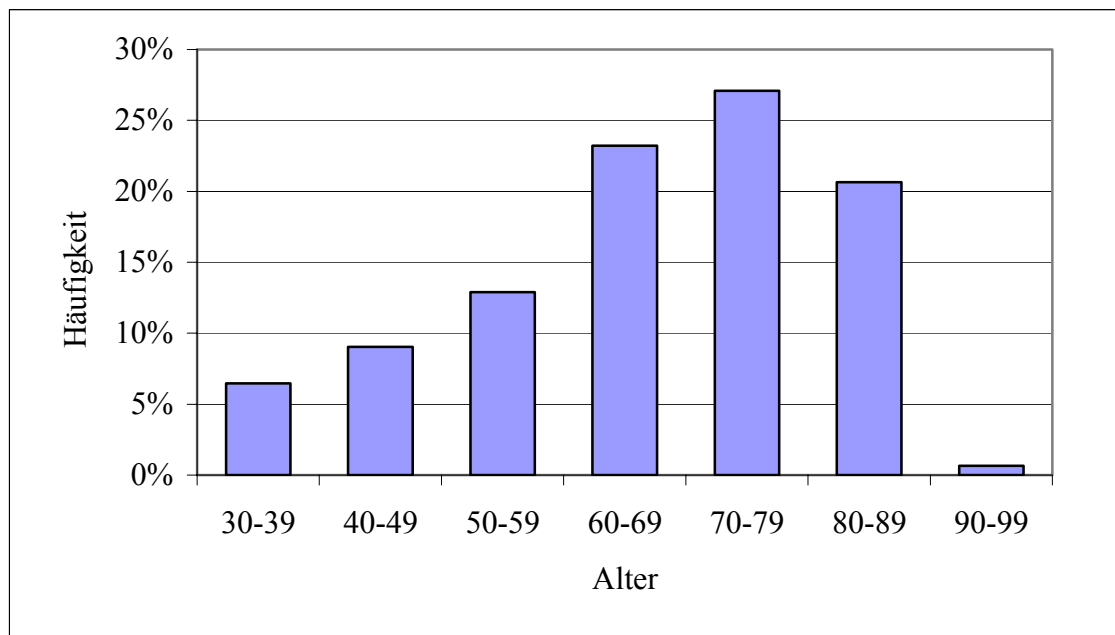


Abb. 3-6 Altersverteilung der Vulvakarzinom-Patientinnen bei Diagnosestellung ($n_{\text{Patientinnen}} = 155$).

Menarche:

Der Altersmittelwert der Menarche von den zur Verfügung stehenden Angaben ($n = 138$) betrug 14 Jahre (± 2). Die jüngste war dabei 11 und die älteste 18 Jahre alt. Bei 73% trat die Menarche zwischen dem 12. und vollendeten 15. Lebensjahr auf.

Menopause:

Bei 16% war die Menopause noch nicht eingetreten, 84% waren postmenopausal ($n = 147$). Das Durchschnittsalter der Menopause lag bei 50 Jahren (± 5).

Parität:

124 Frauen (80%) hatten Kinder geboren. Davon hatten 64% ein oder zwei Kinder, 26% drei oder vier und die restlichen 10% mehr als vier Kinder. Insgesamt waren 20% kinderlos.

Komorbidität:

Zusatzerkrankungen, wie Hypertonus, Herzgefäßerkrankungen, Diabetes mellitus und pulmonale Erkrankungen, waren bei 59% der Frauen angegeben.

Bei den Patientinnen, bei denen Angaben zur eigenen Malignomanamnese aufzufinden waren ($n = 148$), hatten 23 zusätzlich zu dem Plattenepithelkarzinom der Vulva noch ein Zweitmalignom. 74% davon waren gynäkologische Tumoren. (siehe Tab. 3-11)

Tab. 3-11 Zusätzliche Malignome bei Vulvakarzinom-Patientinnen ($n_{\text{Patientinnen}} = 148$).

Malignome	Anzahl	Prozent
keine	125	84%
Mamma Ca	5	3%
andere gyn. Ca	12	8%
Bronchial Ca	1	1%
sonstige	5	3%

Symptome:

Beim Vulvakarzinom berichteten 115 Patientinnen (74%) über Symptome, die restlichen 40 (26%) waren symptomlos. Dabei klagten die Patientinnen über Pruritus vulvae, Brennen, Schmerzen, Fremdkörpergefühl, Blutungen, Sekretion und sonstige Beschwerden (siehe Abb. 3-7).

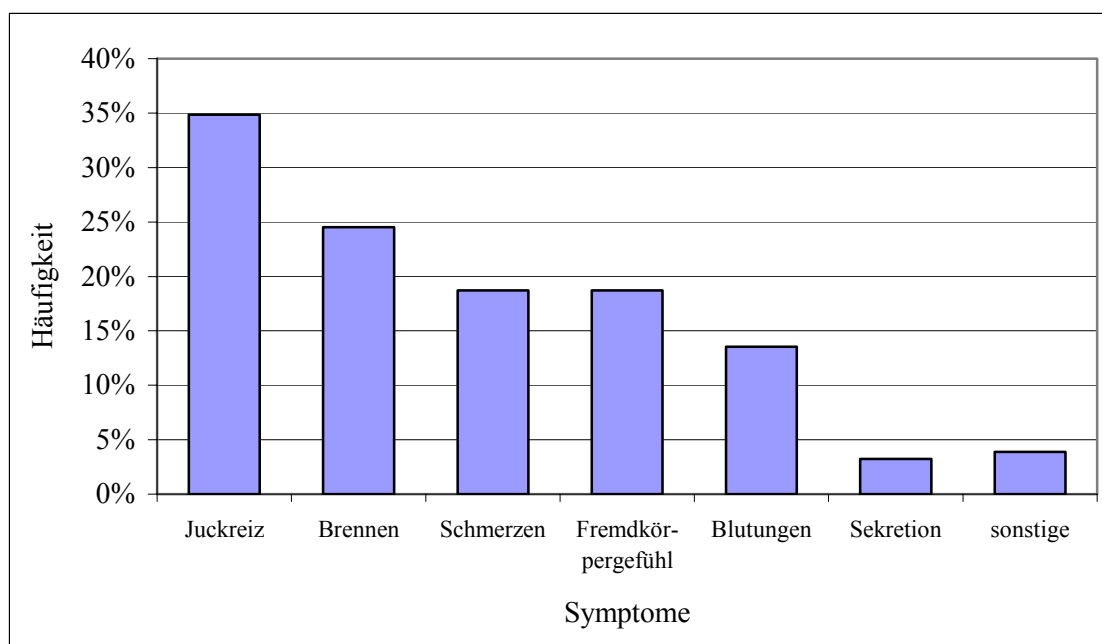


Abb. 3-7 Symptome beim Vulvakarzinom (Mehrfachnennung) ($n_{\text{Patientinnen}} = 115$).

Tumorlokalisation:

Bei 154 Patientinnen gab es Angaben zur Lokalisation. Die Häufigkeitsverteilung ist in Abb. 3-8 dargestellt. Am häufigsten war der Tumor an den kleinen und/oder großen Labien zu finden.

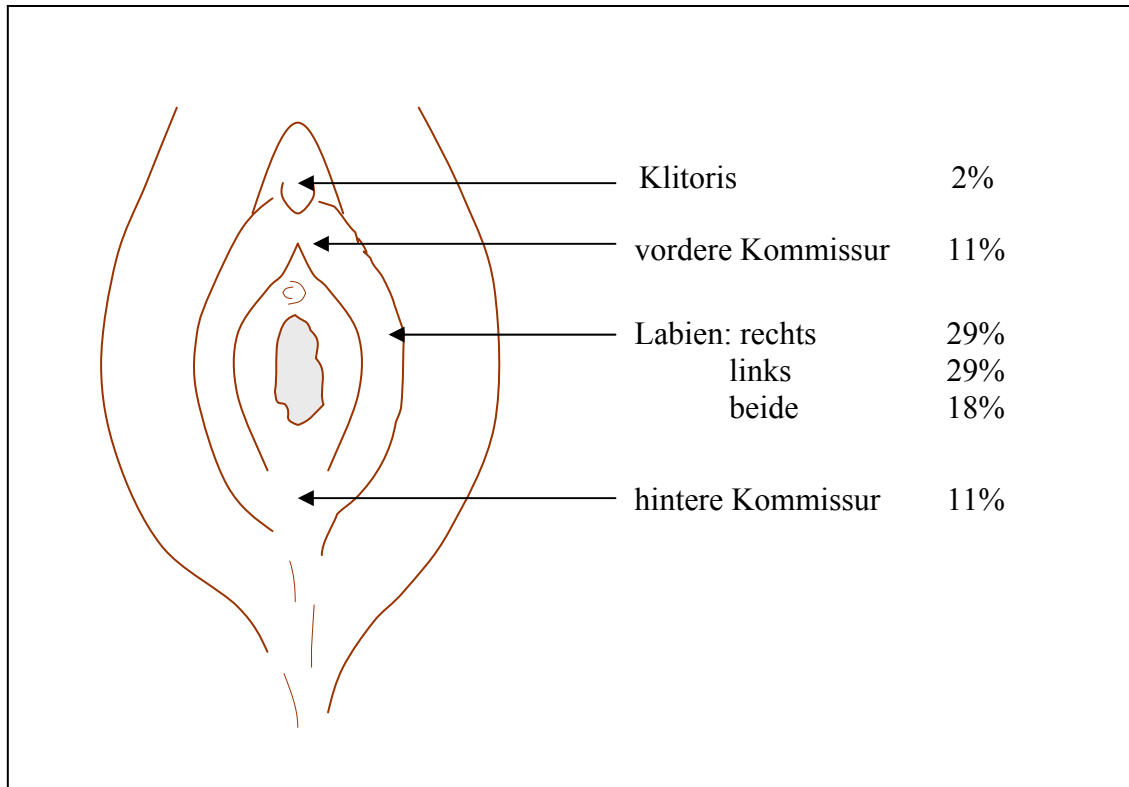


Abb. 3-8 Lokalisation der Vulvakarzinome (n_{Patientinnen} = 154).

Untersuchungsbefund der Vulva:

Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich bei der Inspektion der Vulva am häufigsten ein Exophyt, gefolgt von einem Ulkus (siehe Tab. 3-12).

Tab. 3-12 Untersuchungsbefund bei Inspektion der Vulva (n_{Patientinnen} = 155).

Untersuchungsbefund	Anzahl	Prozent
Exophyt	80	52%
Ulkus	35	23%
Exophyt + Ulkus	14	9%
nicht karzinomverdächtig	26	17%

Präoperative Histologie:

Die histologische Sicherung der Diagnose geschah präoperativ durch eine Biopsie bei 126 Frauen (81%): 30 auswärts, 96 in der I. UFK. Bei 19% erfolgte direkt die Primärtherapie.

Lymphknotenstatus klinisch:

In 42% konnten inguinal, soweit Angaben vorlagen (n = 142), vergrößerte und suspekto Lymphknoten getastet werden. In 58% zeigten sich klinisch unauffällige Lymphknoten.

Behandlung lokal:

Das Vulvakarzinom wurde in allen Fällen operativ versorgt, ggf. in Kombination mit Bestrahlung. Die unterschiedlichen Operationsverfahren sind in Tab. 3-13 aufgelistet.

Tab. 3-13 Ersttherapie der Vulvakarzinome (n_{Patientinnen} = 155).

Ersttherapie	Anzahl	Prozent
radikale Vulvektomie	99	64%
Hemivulvektomie	6	4%
partielle Vulvektomie	18	12%
lokale Tumorexzision	32	21%

Behandlung regional:

Insgesamt wurden 71%, also 109 Fälle, gleichzeitig inguinal lymphonodektomiert. Die Verteilung ist in Tab. 3-14 aufgelistet. Bei 46 Patientinnen wurden die Lymphknoten nicht entfernt.

**Tab. 3-14 Lymphknotenentfernung in Abhängigkeit vom Operationsverfahren (n_{Patientinnen} = 155),
LE = Lymphonodektomie.**

Ersttherapie	bilaterale LE	ipsilaterale LE	Sampling	keine	Gesamt
radikale Vulvektomie	74	7		18	99
Hemivulvektomie	3	2		1	6
partielle Vulvektomie	6	3	1	8	18
lokale Tumorexzision	6	7		19	32
Gesamt	89	19	1	46	155

Gründe für das teilweise eingeschränkt radikal operative Vorgehen waren zum einen das hohe Alter der Patientinnen und die damit einhergehende Multimorbidität. Zum anderen wurde bei minimal invasiven Karzinomen zum Teil wegen einer sehr geringen Infiltrationstiefe (≤ 1 mm) auf die Lymphonodektomie verzichtet. In sechs Fällen war die Erkrankung so weit fortgeschritten, dass nur noch palliativ behandelt wurde.

3.2.3 Follow-up

Das Follow-up wurde bis mindestens Januar 2003 durchgeführt.

Bei 9 Patientinnen von insgesamt 155, konnten nach der ersten Operation keine Daten mehr erhoben werden. Bei den anderen Frauen betrug die mittlere Beobachtungszeit 56 Monate (range: 1 Monat bis 199 Monate).

Rezidive:

Insgesamt traten bei 50 Patientinnen (34%) Rezidive auf ($n = 146$). Die Verteilung ist in Tab. 3-15 dargestellt. Am häufigsten fanden sich Lokalrezidive.

Tab. 3-15 Häufigkeitsverteilung der Rezidive bei Vulvakarzinomen ($n_{\text{Rezidive}} = 50$).

Rezidivlokalisierung	Anzahl	Prozent
lokal	42	84%
inguinale Lymphknoten	6	12%
pelvine Lymphknoten	1	2%
Fernmetastasen	1	2%

Im Median betrug die rezidivfreie Zeit 17 Monate mit einer stark links-schiefen Verteilung zwischen minimal 3 und maximal 150 Monaten (deshalb wird hier auf die Angabe der mittleren rezidivfreien Zeit verzichtet).

Überleben:

80 Patientinnen verstarben. 36 von diesen tumorabhängig am Vulvakarzinom, bei 35 lag eine andere Todesursache zu Grunde und bei 9 war die Todesursache unbekannt.

Die 5-Jahresüberlebensrate der Patientinnen betrug 76%.

3.2.4 Histologie

3.2.4.1 Ergebnisse der histologischen Beurteilung

Histologischer Tumortyp:

Die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen histologischen Typen sind in Tab. 3-16 aufgelistet. Am häufigsten kam das verhornende Plattenepithelkarzinom vor.

Auch die Altersverteilung bezogen auf die verschiedenen histologischen Typen ist in Tab. 3-16 dargestellt.

Tab. 3-16 Histologischer Typ der Vulvakarzinome und Altersmittelwert ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Tumortyp	Anzahl	Prozent	mittleres Alter (\pm)
verhornend	100	65%	70 (\pm 12)
nicht verhornend	12	8%	68 (\pm 11)
basaloid	26	17%	56 (\pm 15)
kondylomatös	17	11%	64 (\pm 16)

Epithelveränderungen am Karzinomrand:

28 Patientinnen zeigten keine das Karzinom umgebenden Epithelveränderungen und bei 11 war das angrenzende Epithel nicht beurteilbar.

Am häufigsten fand sich VIN III vom undifferenzierten Typ. Bei vier Patientinnen wurden gleichzeitig zwei unterschiedliche Epithelveränderungen beobachtet. (siehe Tab. 3-17)

Tab. 3-17 Epithelveränderungen am Karzinomrand.

Epithelveränderungen am Karzinomrand (Mehrfachnennung)	Anzahl	Prozent
keine	28	19%
VIN III undifferenziert	36	24%
VIN III differenziert	16	11%
Lichen sclerosus	27	18%
squamöse Hyperplasie	41	28%

Infiltrationstiefe:

Die kleinste Infiltrationstiefe betrug 1 mm, die größte 25 mm. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tab. 3-18 aufgelistet.

Tab. 3-18 Infiltrationstiefe der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 154$).

Infiltrationstiefe (mm)	Anzahl	Prozent
1	13	8%
2-3	35	23%
4-5	26	17%
6-10	50	32%
>10	30	20%

Entzündungsreaktion:

Das Tumorstroma war bis auf einen Fall mit Entzündungszellen infiltriert. Am häufigsten war die Entzündungsreaktion mäßig bis stark (siehe Tab. 3-19).

Tab. 3-19 Entzündungsreaktion der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Entzündung	Anzahl	Prozent
keine	1	1%
wenig	32	21%
mäßig	48	31%
stark	56	36%
sehr stark	18	12%

Mitosenzahl:

Knapp die Hälfte der Tumoren hatten wenig Mitosen. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tab. 3-20 dargestellt.

Tab. 3-20 Mitosenzahl der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Mitosen	Anzahl	Prozent
wenig	71	46%
mäßig	49	32%
viel	35	23%

Nekrosen:

Nekrosen traten ungefähr in einem Drittel aller Karzinomen auf. Die Häufigkeitsverteilung ist Tab. 3-21 zu entnehmen.

Tab. 3-21 Nekrosen der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Nekrosen	Anzahl	Prozent
keine	111	72%
mittel	33	21%
ausgedehnt	11	7%

Differenzierungsgrad:

Die Hälfte aller Plattenepithelkarzinome waren mäßig differenziert (G2). Hochdifferenzierte (G1) und gering differenzierte (G3) Tumoren kamen seltener vor. (siehe Tab. 3-22)

Tab. 3-22 Grading der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Grading	Anzahl	Prozent
G1	52	34%
G2	77	50%
G3	26	17%

Lymphangiosis carcinomatosa:

Ein Lymphangiosis carcinomatosa konnte bei der Hälfte aller Patientinnen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3-23).

Tab. 3-23 Lymphangiosis carcinomatosa der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Lymphangiosis carc.	Anzahl	Prozent
keine	75	48%
vorhanden	80	52%

Hämangiosis carcinomatosa:

Ein Einbruch von Tumorzellen in die Blutgefäße (Hämangiosis carcinomatosa) kam selten vor (siehe Tab. 3-24).

Tab. 3-24 Hämangiosis carcinomatosa der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Hämangiosis carc.	Anzahl	Prozent
keine	142	92%
vorhanden	13	8%

Lymphknotenbefall:

Bei 109 Patientinnen wurden die Lymphknoten entfernt. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tab. 3-25 aufgelistet. Von den Patientinnen bei denen Lymphknotenmetastasen auftraten, waren 70% unilateral und 30% bilateral befallen.

Tab. 3-25 Lymphknotenbefall ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

Lymphknotenbefall	Anzahl	Prozent
keiner	62	57%
vorhanden	47	43%

Lokales Tumorstadium:

Das lokale Tumorstadium pT2 kam am häufigsten vor, danach folgte das pT1 Stadium. Das pT4 Stadium kam im Patientinnenkollektiv nicht vor. (siehe Tab. 3-26)

Tab. 3-26 pT-Stadium der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

pT-Stadium	Anzahl	Prozent
pT1	67	43%
pT2	79	51%
pT3	9	6%

Entfernung in sano:

Bei 155 operierten Patientinnen wurde in 77% das Plattenepithelkarzinom in sano entfernt (siehe Tab. 3-27).

Tab. 3-27 Entfernung in sano der Vulvakarzinome ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Entfernung in sano	Anzahl	Prozent
in sano	119	77%
non in sano	36	23%

3.2.4.2 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von den histologischen Parametern

Histologische Parameter wie der histologische Tumortyp, die Epithelveränderungen am Karzinomrand, die Entzündungsreaktion, die Nekrosen oder die Hämangiosis carcinomatosa zeigten keine Assoziation zum Lymphknotenbefall.

Im folgenden Abschnitt werden die histologischen Parameter besprochen, bei denen eine Abhängigkeit zum Nodalstatus gefunden wurde.

Infiltrationstiefe:

Die Lymphknotenentfernung und der Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ist in Tab. 3-28 dargestellt. Patientinnen mit einer Infiltrationstiefe über 5 mm hatten signifikant mehr Lymphknotenmetastasen ($p = 0,006$, X^2 -Test).

Tab. 3-28 Lymphknotenentfernung und Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 108$).

LE = Lymphonodektomie; LkMeta = Lymphknotenmetastase.

Infiltrationstiefe (mm)	LE	Lk Meta	χ^2 -Test
1	2	0	0,006
2 - 3	26	6	
4 - 5	24	9	
6 - 10	36	19	
>10	20	12	

Die Häufigkeit an befallenen Lymphknoten nahm mit der Infiltrationstiefe zu (siehe Abb. 3-9).

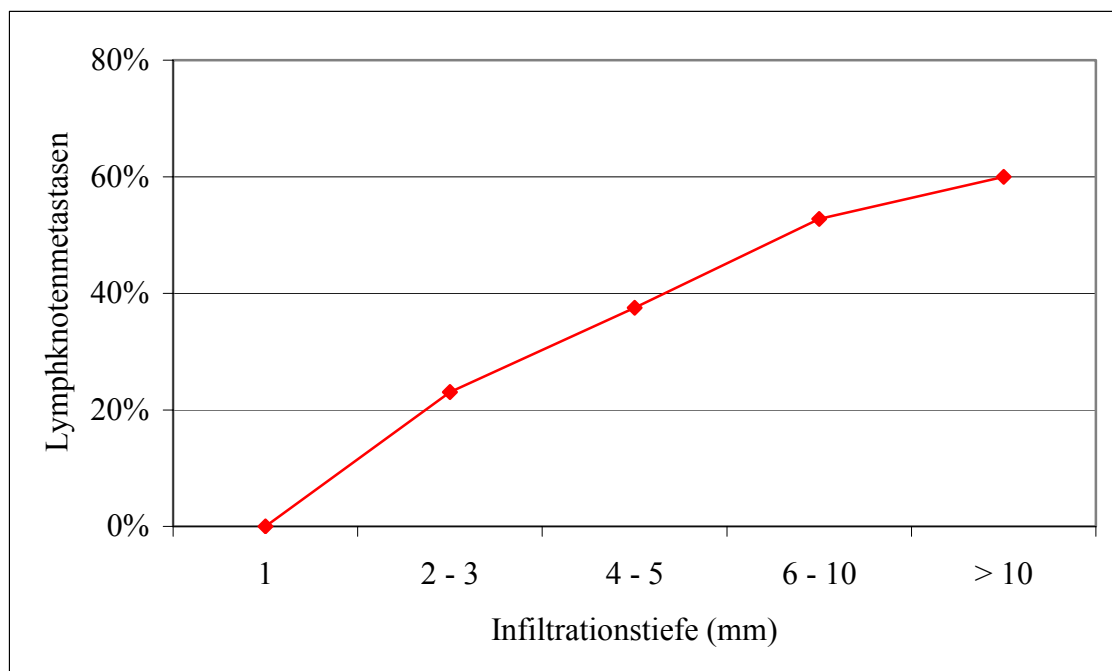


Abb. 3-9 Häufigkeit des Lymphknotenbefalls in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 108$).

Mitosenzahl:

Karzinome mit wenig Mitosen zeigten signifikant ($p = 0,04$, X^2 -Test) weniger Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Karzinomen mit mäßigen oder vielen Mitosen (siehe Tab. 3-29 und Abb. 3-10).

Tab. 3-29 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Mitosenzahl ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

Mitosen	LE	Lk Meta	X^2 -Test
wenig	52	17	0,04
mäßig	34	16	
viel	23	14	

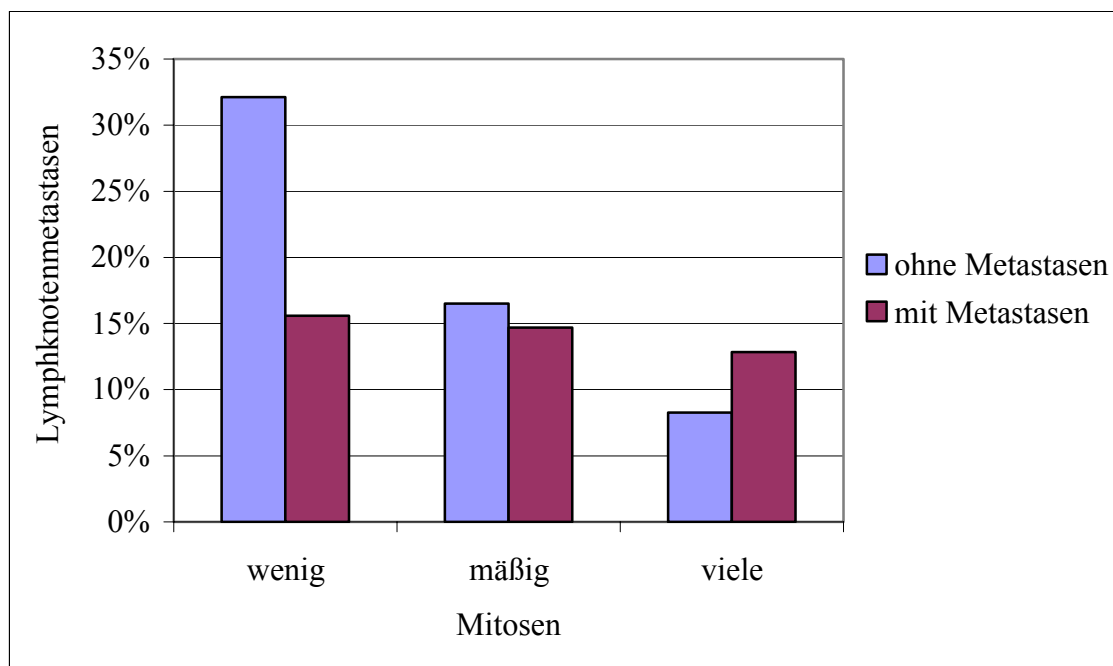


Abb. 3-10 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit von der Mitosenzahl ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

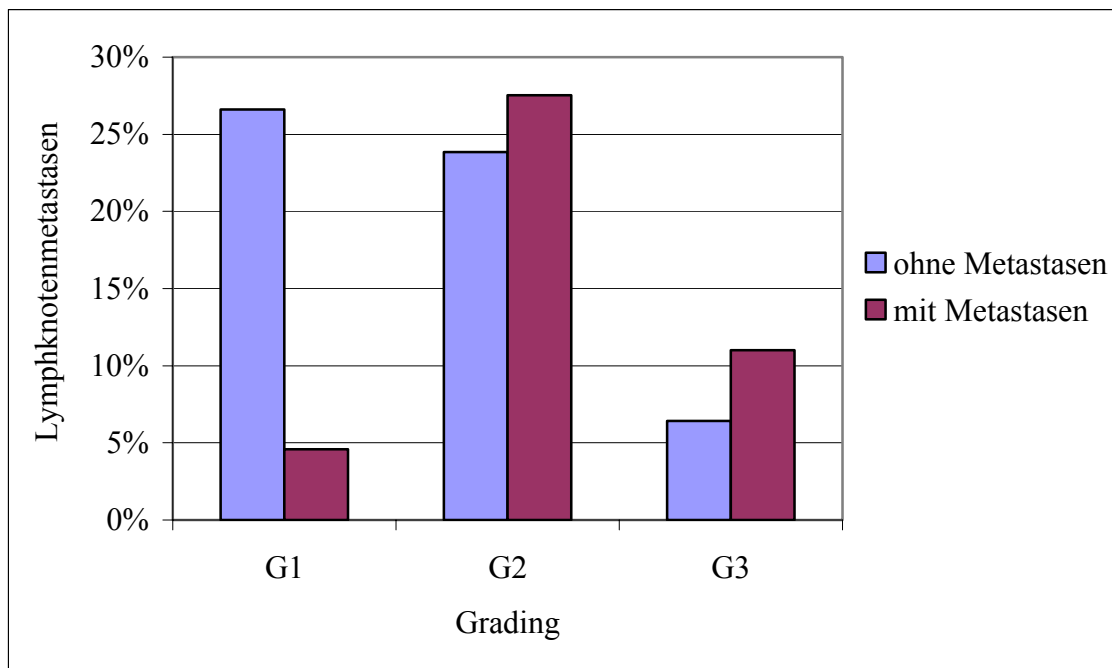
Bei Tumoren mit wenig Mitosen wurden seltener Lymphknotenmetastasen nachgewiesen ($p = 0,04$, X^2 -Test).

Differenzierungsgrad:

G1 Tumoren zeigten statistisch signifikant weniger Lymphknotenmetastasen gegenüber G2 und G3 Tumoren ($p < 0,0001$, X^2 -Test) (siehe Tab. 3-30 und Abb. 3-11).

Tab. 3-30 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

Grading	LE	Lk Meta	X ² -Test
G1	34	5	p < 0,0001
G2	56	30	
G3	19	12	

**Abb. 3-11 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).**

Bei G1 Tumoren wurden weniger Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (p < 0,0001, X²-Test).

Lymphangiosis carcinomatosa:

Der Befall der Lymphgefäße war mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen hoch signifikant assoziiert (p < 0,0001, X²-Test) (siehe Tab. 3-31).

Tab. 3-31 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

Lymphangiosis carc.	LE	Lk Meta	X ² -Test
keine	50	10	p < 0,0001
vorhanden	59	37	

Lokales Tumorstadium:

pT1 zeigte signifikant weniger Lymphknotenmetastasen als pT2 und pT3 ($p = 0,002$, χ^2 -Test) (siehe Abb. 3-12). So war nur ein Viertel der Lymphknoten im pT1-Stadium befallen (siehe Tab. 3-32).

Tab. 3-32 Lymphknotenbefall in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

pT-Stadium	LE	Lk Meta	χ^2 -Test
pT1	45	11	$p = 0,002$
pT2	61	34	
pT3	3	2	

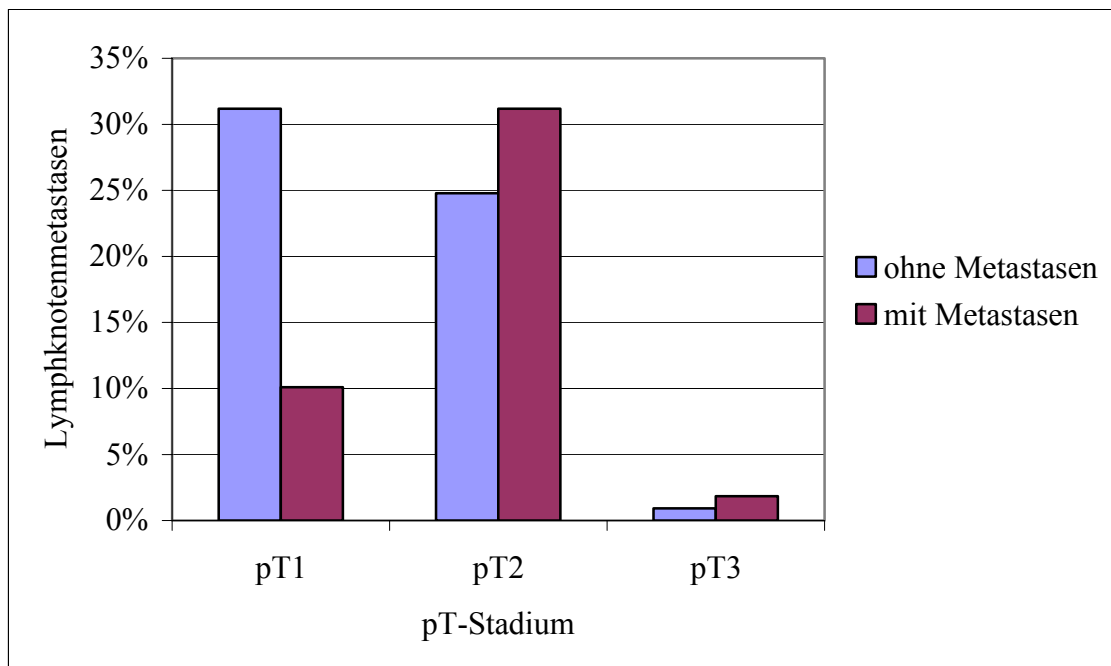


Abb. 3-12 Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Lymphonodektomierte}} = 109$).

Im pT1- Stadium sind signifikant weniger Lymphknotenmetastasen ($p = 0,002$, χ^2 -Test).

3.2.4.3 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den histologischen Parametern

Nicht assoziiert mit Rezidiven waren der histologische Tumortyp, die Epithelveränderungen am Karzinomrand, die Infiltrationstiefe, die Entzündungsreaktion, die Mitosenzahl, der Differenzierungsgrad, die Nekrosen, die Lymphangiosis carcinomatosa und die Hämangiosis carcinomatosa.

Im Folgenden werden die Parameter besprochen, bei denen eine Abhängigkeit zur Rezidiventwicklung gefunden wurde.

Lokales Tumorstadium:

Patientinnen mit Karzinomen im pT3-Stadium hatten im Vergleich zu pT1 und pT2 eine signifikant höhere Rate an Rezidiven (100% versus 34%; $p = 0,001$, exakter Test nach Fisher).

Tab. 3-33 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

pT-Stadium	Anzahl	Rezidive	Test
pT1	64	21	$p = 0,001$
pT2	62	22	
pT3	7	7	

Entfernung in sano:

Patientinnen, deren Karzinome nicht im Gesunden entfernt wurden, entwickelten häufiger Rezidive (60% versus 31%; $p = 0,004$, X^2 -Test).

Tab. 3-34 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von der Entfernung in sano ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

Entfernung in sano	Anzahl	Rezidive	X^2 -Test
in sano	103	32	$p = 0,004$
non in sano	30	18	

Wie in 3.2.1 bereits beschrieben, wurde das rezidivfreie Intervall mit Daten von 133 Patientinnen berechnet.

Für das mittlere rezidivfreie Intervall fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim histologischen Tumortyp, den Epithelveränderungen am Karzinomrand, der Entzündungsreaktion, der Mitosenzahl, den Nekrosen, der Lymphangiosis carcinomatosa und der Hämangiosis carcinomatosa.

Im folgenden Abschnitt werden die histologischen Parameter beschrieben, bei denen eine Abhängigkeit zum Nodalstatus gefunden wurde.

Infiltrationstiefe:

Die Infiltrationstiefen bis 9 mm unterschieden sich hinsichtlich des mittleren rezidivfreien Intervalls kaum. Traten Infiltrationstiefen von über 9 mm auf, so sank das rezidivfreie Intervall auf 78 Monate ($p = 0,03$, Log-Rank Test). (siehe Tab. 3-35)

Tab. 3-35 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 132$).

Infiltrationstiefe (mm)	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
1 - 4	60	113 (± 11)
5 - 9	41	111 (± 14)
> 9	31	78 (± 17)

Lymphknotenbefall:

Waren Lymphknotenmetastasen vorhanden, trat das Rezidiv früher auf im Vergleich zu metastasenfreien Patientinnen ($p = 0,02$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-36).

Tab. 3-36 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 94$).

Lymphknotenbefall	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
keiner	58	138 (± 13)
vorhanden	36	92 (± 16)

Lokales Tumorstadium:

Auch beim lokalen Tumorstadium unterschieden sich die ersten zwei Stadien pT1 und pT2 hinsichtlich ihrer mittleren rezidivfreien Zeit kaum. Hingegen verkürzte sich im Stadium pT3 das rezidivfreie Intervall auf 36 Monate ($p = 0,002$, Log-Rank Test). (siehe Tab. 3-37)

Tab. 3-37 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

pT-Stadium	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
pT1	64	111 (± 11)
pT2	62	113 (± 13)
pT3	7	36 (± 19)

Entfernung in sano:

Rezidive entwickelten sich bei Karzinomen, die im Gesunden ausgeschnitten wurden, später im Vergleich zu Karzinomen, die nicht im Gesunden entfernt wurden ($p = 0,002$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-38).

Tab. 3-38 Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit von der Entfernung in sano ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

Entfernung in sano	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
in sano	103	116 (± 9)
non in sano	30	72 (± 16)

3.2.4.4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den histologischen Parametern

Wie in 3.2.1 bereits beschrieben, wurde das Gesamtüberleben mit Daten von 146 Patientinnen berechnet.

Die verschiedenen histologischen Tumortypen, Epithelveränderungen am Karzinomrand, Entzündungsreaktionen, Mitosen, Nekrosen und Entfernung in sano zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gesamtüberlebenszeit.

Im Folgenden werden die Parameter besprochen, bei denen Unterschiede im Gesamtüberleben gefunden wurde.

Infiltrationstiefe:

Mit zunehmender Infiltrationstiefe sank die Überlebenszeit statistisch signifikant ($p < 0,0001$, Log-Rank Test). Patientinnen mit einer Infiltrationstiefe > 9 mm hatten eine 5-Jahresüberlebensrate von 49% (siehe Tab. 3-39 und Abb. 3-13).

Tab. 3-39 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 145$).

Infiltrationstiefe (mm)	Anzahl	5-Jahresüberlebensrate (%)
1 - 4	61	96
5 - 9	46	68
> 9	38	49

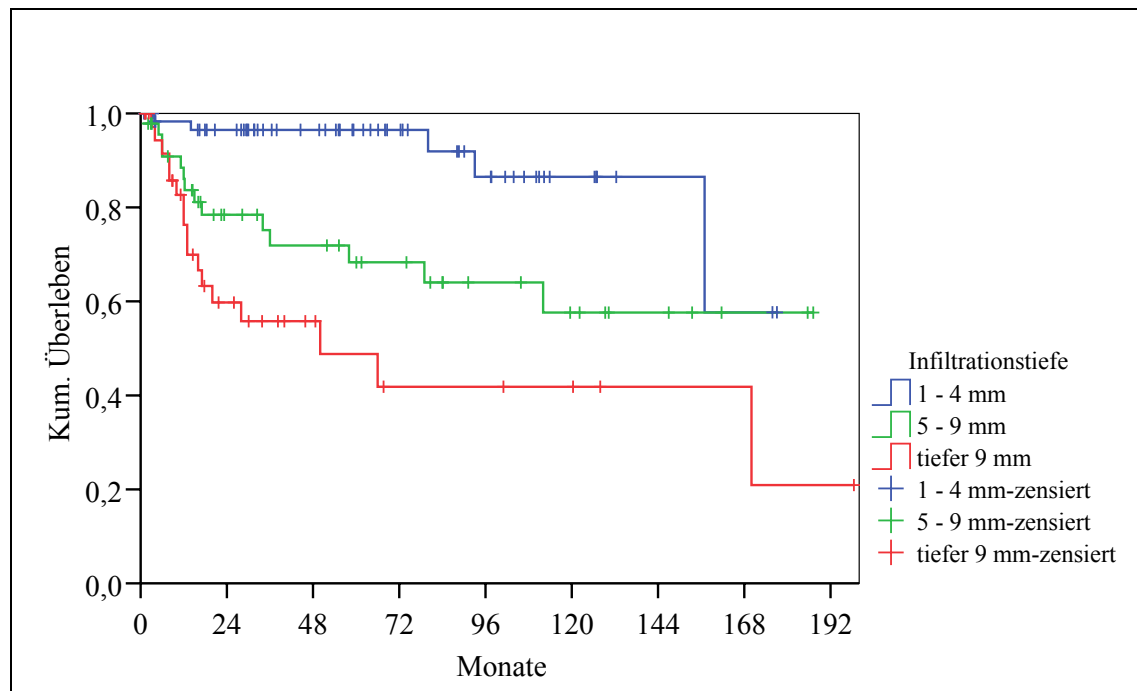


Abb. 3-13 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 145$).

Signifikant kürzeres Überleben bei größeren Infiltrationstiefen ($p < 0,0001$, Log-Rank Test).

Differenzierungsgrad:

Die Überlebenszeit sank, je schlechter der Tumor differenziert war ($p = 0,0001$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-40 und Abb. 3-14).

Tab. 3-40 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Grading	Anzahl	5-Jahresüberlebensrate (%)
G1	48	93
G2	73	74
G3	25	47

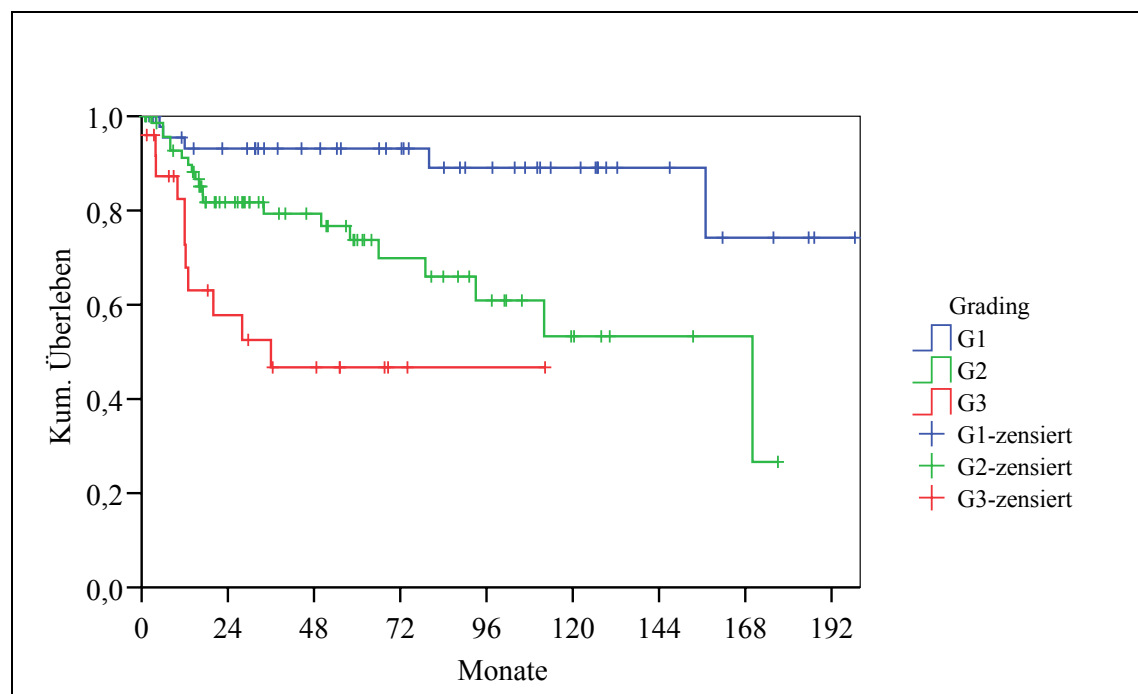


Abb. 3-14 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Signifikant kürzeres Überleben bei schlecht differenzierten Karzinomen ($p = 0,0001$, Log-Rank Test).

Lymphangiosis carcinomatosa:

Trat im Karzinom eine Lymphangiosis carcinomatosa auf, so sank die Überlebenszeit ($p < 0,0001$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-41 und Abb. 3-15).

Tab. 3-41 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa

($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Lymphangiosis carc.	Anzahl	5-Jahresüberlebens- rate (%)
keine	70	93
vorhanden	76	61

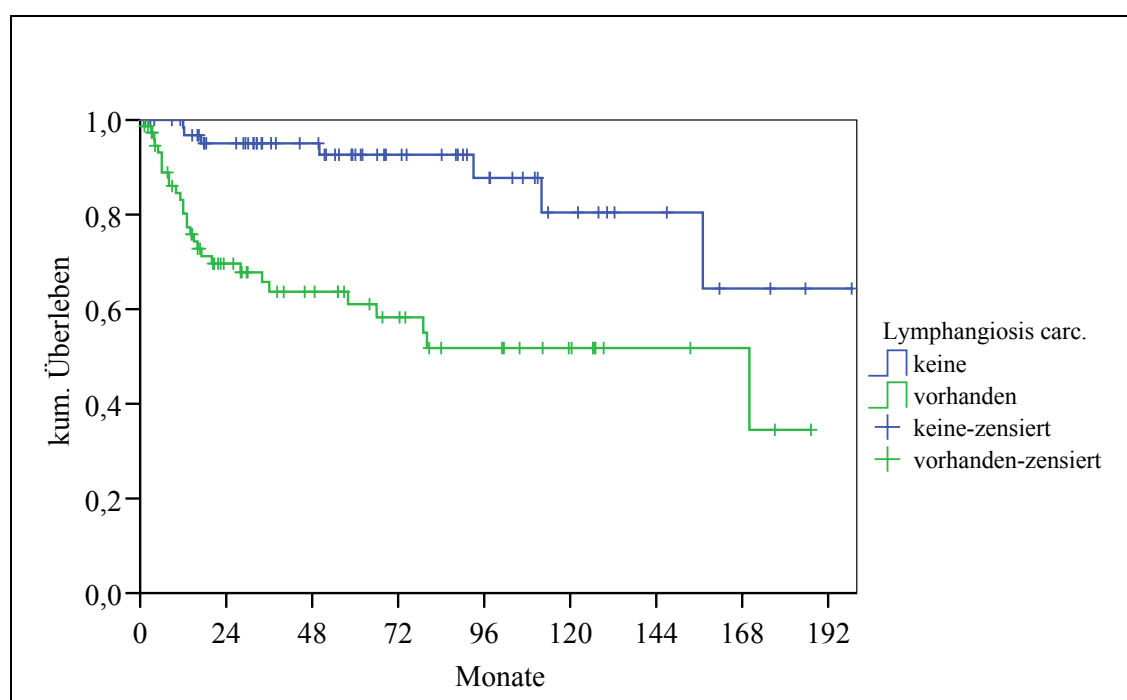


Abb. 3-15 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Signifikant kürzeres Überleben bei Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa ($p < 0,0001$, Log-Rank Test).

Hämangiosis carcinomatosa:

Auch beim Vorhandensein einer Hämangiosis carcinomatosa verkürzte sich Überlebenszeit ($p = 0,01$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-42 und Abb. 3-16).

Tab. 3-42 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Hämangiosis carc.	Anzahl	5-Jahresüberlebens- rate (%)
keine	133	79
vorhanden	13	49

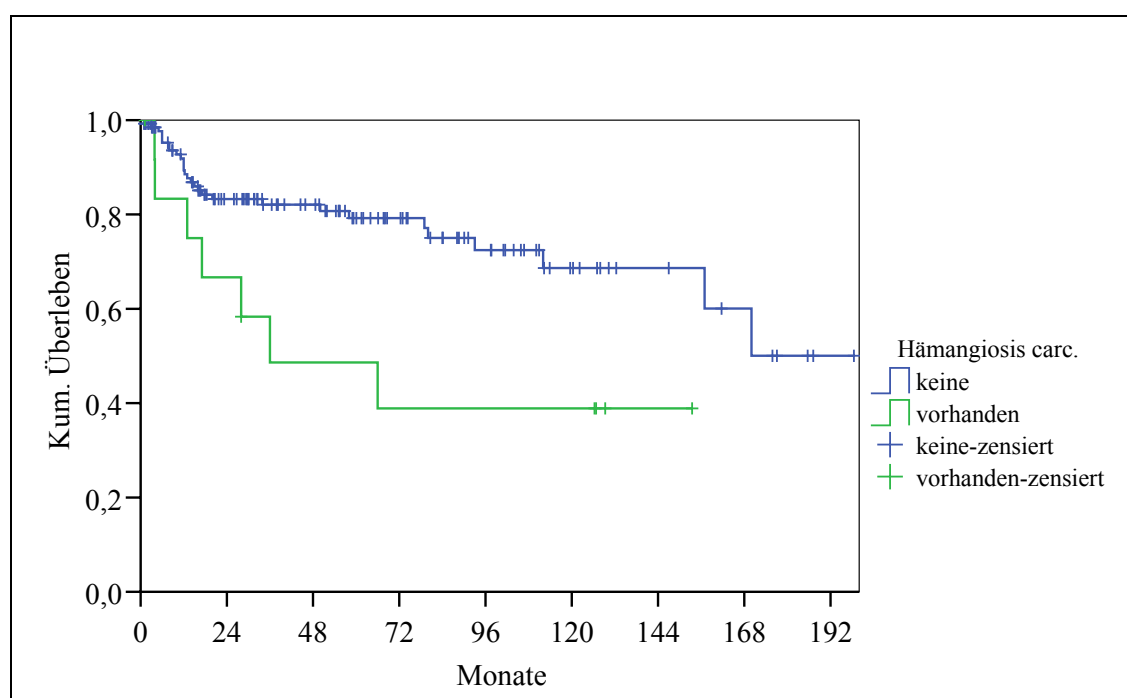


Abb. 3-16 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$). Signifikant kürzeres Überleben bei Vorhandensein einer Hämangiosis carcinomatosa ($p = 0,01$, Log-Rank Test).

Lymphknotenbefall:

Waren die inguinalen Lymphknoten metastatisch befallen, so sank die Überlebenszeit ($p < 0,0001$, Log-Rank Test). Patientinnen mit Lymphknotenbefall hatten eine 5-Jahresüberlebensrate von 57% (siehe Tab. 3-43 und Abb. 3-17).

Tab. 3-43 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 104$).

Lymphknotenbefall	Anzahl	5-Jahresüberlebensrate (%)
keiner	58	98
vorhanden	46	57

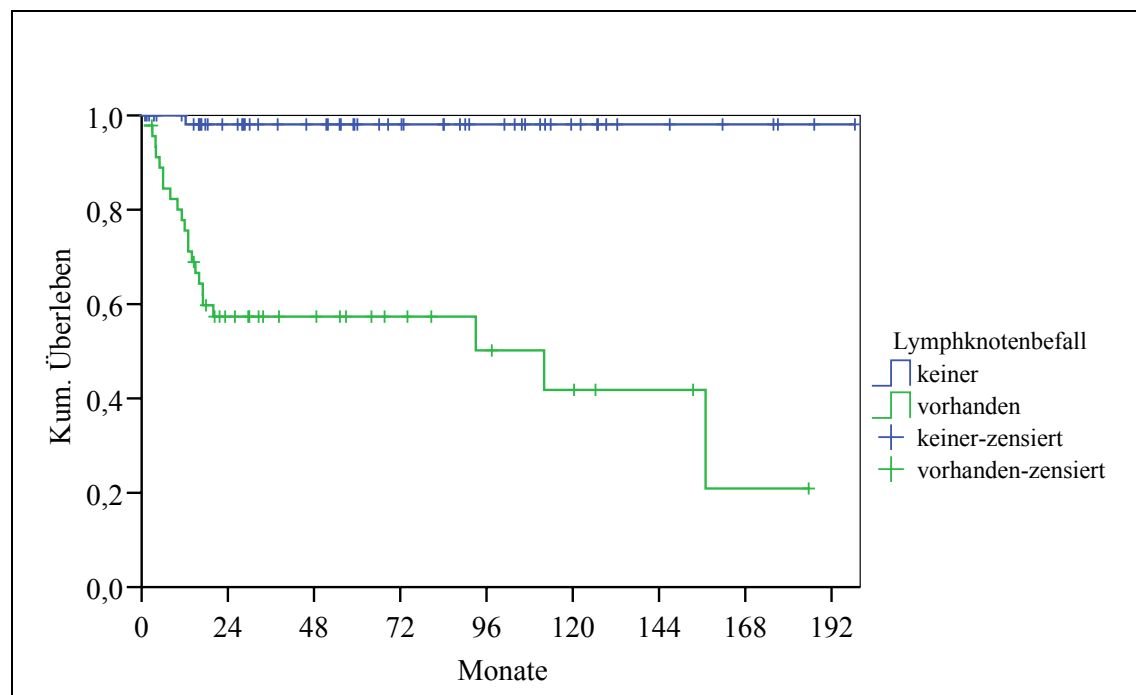


Abb. 3-17 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 104$).

Signifikant kürzeres Überleben bei Vorhandensein von ing. Metastasen ($p < 0,0001$, Log-Rank Test).

Lokales Tumorstadium:

Die Überlebenszeit sank mit fortschreitendem lokalem Tumorstadium ($p < 0,0001$, Log-Rank Test). Im pT3-Stadium betrug die 5-Jahresüberlebensrate 33% (siehe Tab. 3-44 und Abb. 3-18).

Tab. 3-44 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

pT-Stadium	Anzahl	5-Jahresüberlebensrate (%)
pT1	65	94
pT2	72	66
pT3	9	33

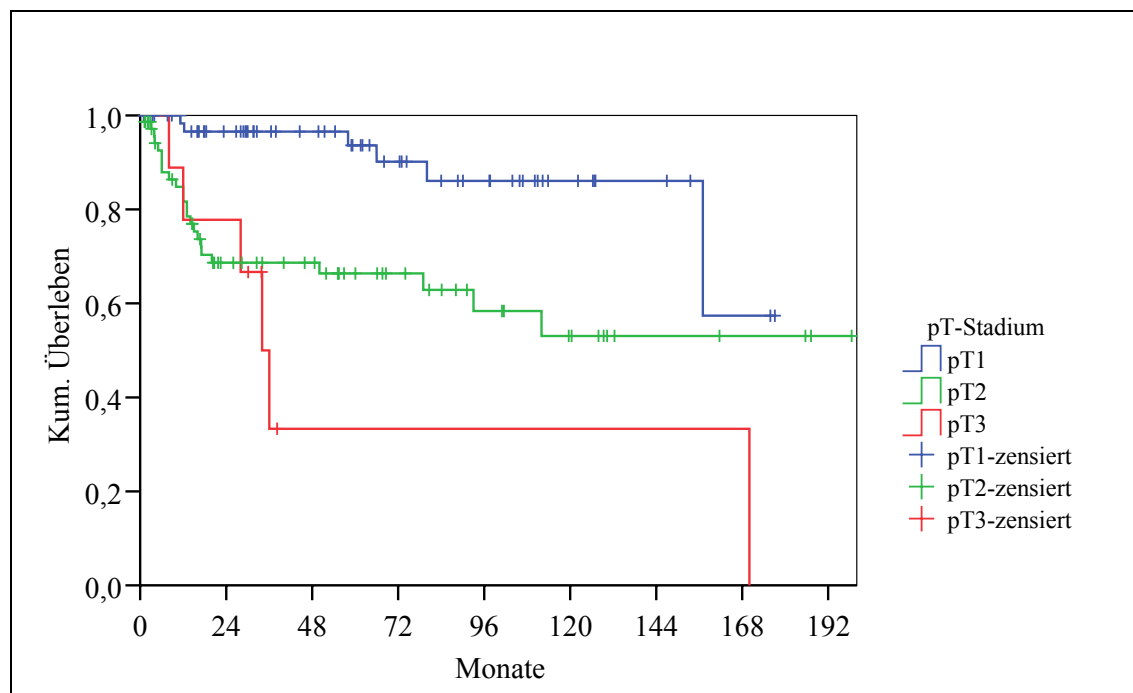


Abb. 3-18 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pT-Stadium ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Signifikant kürzeres Überleben bei höherem pT-Stadium ($p < 0,0001$, Log-Rank Test).

Entfernung in sano:

Die Überlebenszeit nahm ab, wenn das Karzinom nicht im Gesunden entfernt wurde ($p = 0,002$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-45 und Abb. 3-19).

Tab. 3-45 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Entfernung in sano ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Entfernung in sano	Anzahl	5-Jahresüberlebensrate (%)
in sano	111	84
non in sano	35	50

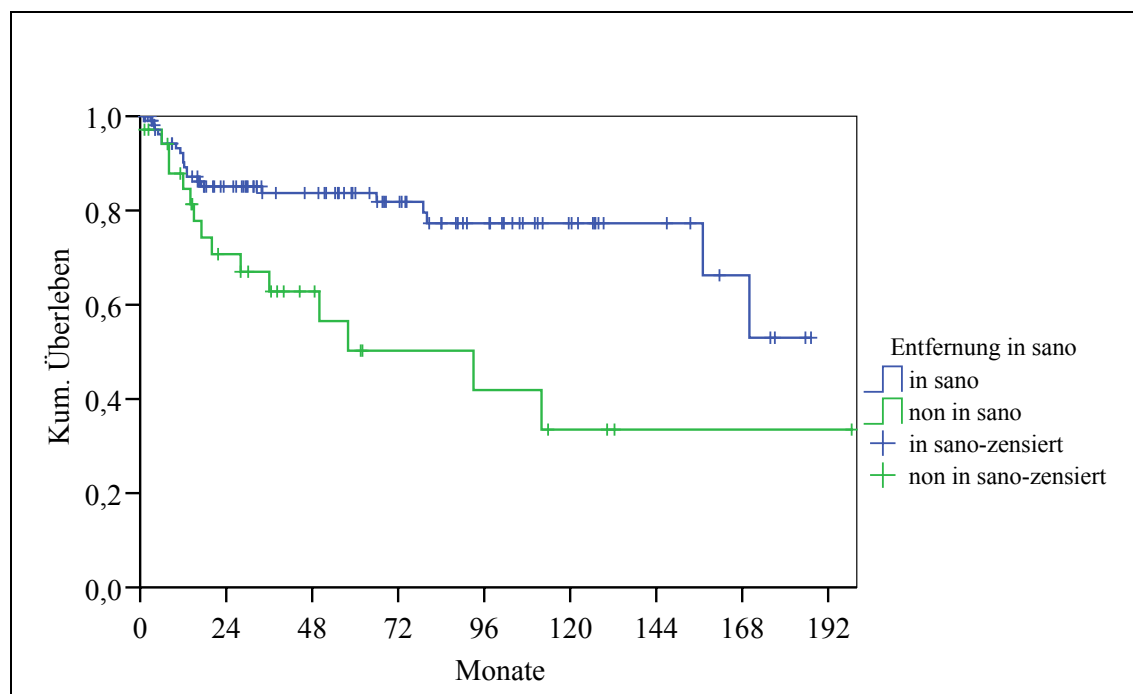


Abb. 3-19 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Entfernung in sano ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Signifikant kürzeres Überleben, wenn das Karzinom nicht im Gesunden entfernt wurde ($p = 0,002$, Log-Rank Test).

3.2.5 Immunhistologie

3.2.5.1 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2

Ein positives Färbeergebnis zeigte sich als zytoplasmatische Färbung vor allem an der Invasionsfront.

43 Präparate waren negativ, 112 waren positiv. Die Verteilung ist in Tab. 3-46 aufgelistet.

Tab. 3-46 Färbeergebnisse von laminin-5-gamma-2 bei Vulvakarzinomen ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Färbeergebnis	Anzahl	Prozent
negativ	43	28%
fokal positiv	38	25%
$\leq 50\%$ positiv	49	32%
$> 50\%$ positiv	25	16%

In Abb. 3-20, Abb. 3-21 und Abb. 3-22 sind Beispiele positiver Färbeergebnisse fotografiert.

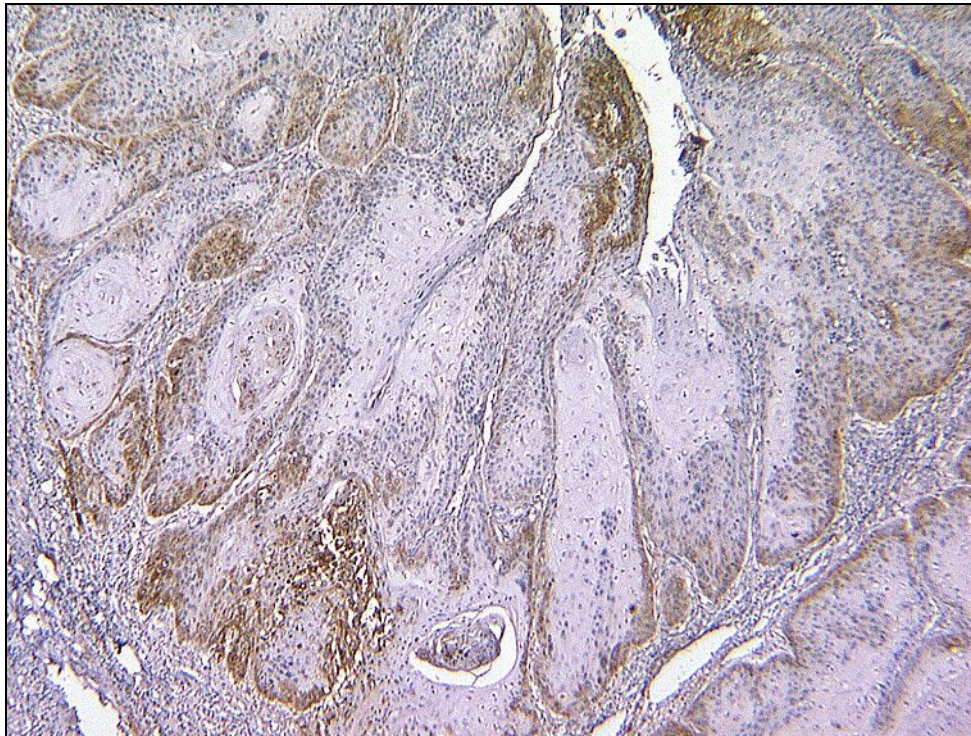


Abb. 3-20 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom:
Akkumulation der laminin-5-gamma-2 Kette an der Stroma-Tumor-Grenze.

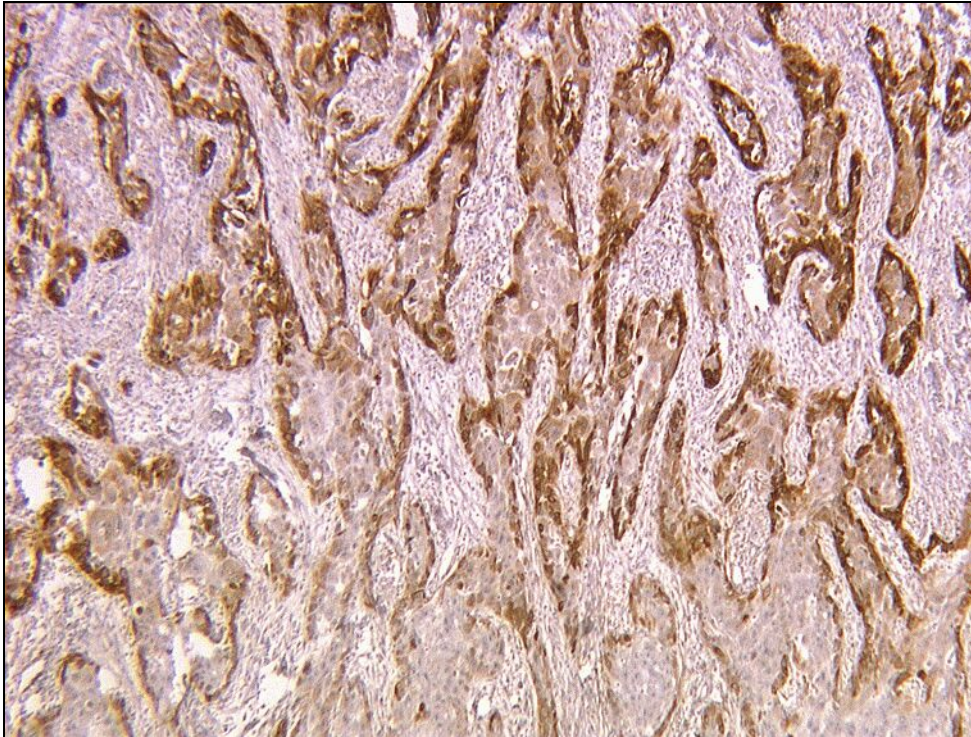


Abb. 3-21 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom:
positive Färbung der Vulvakarzinomzellen, die das Stroma infiltrieren.

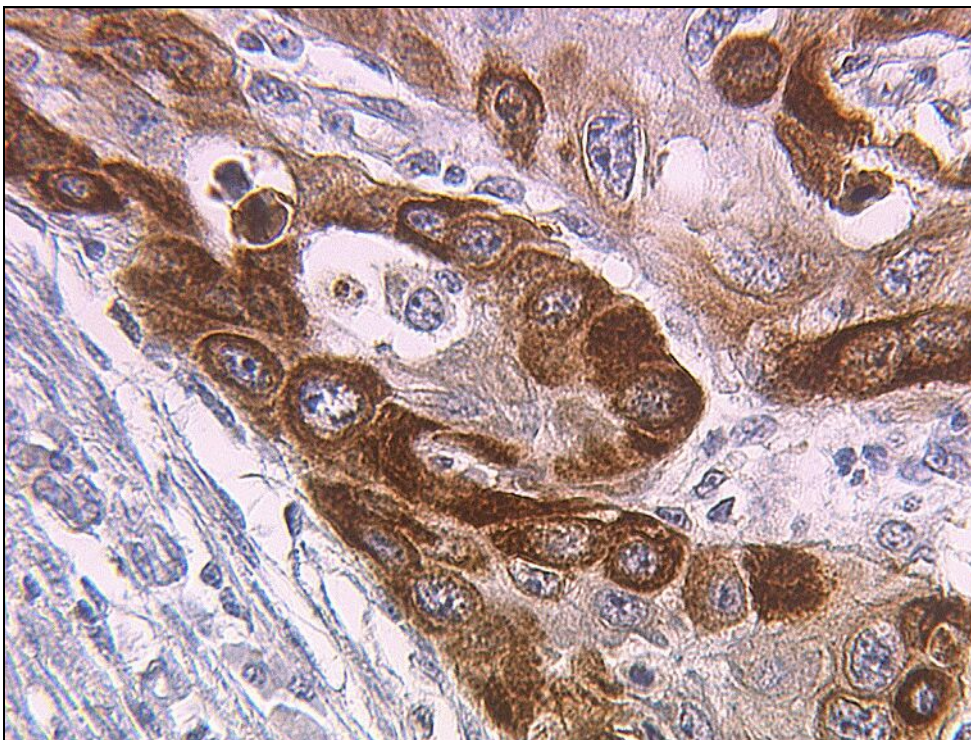


Abb. 3-22 Foto der laminin-5-gamma-2 Färbung im Vulvakarzinom:
positive Färbung im Zytoplasma der Vulvakarzinomzellen.

3.2.5.2 Histologische Parameter in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen

Keine Assoziation zu den Färbeergebnissen war beim histologischen Tumortyp, der Epithelveränderung am Karzinomrand, der Entzündungsreaktion, der Mitosenzahl und den inguinalen Lymphknotenmetastasen zu finden.

Im folgenden Abschnitt werden die histologischen Parameter aufgelistet, die eine Abhängigkeit von den Färbeergebnissen zeigten.

Infiltrationstiefe:

Tumoren mit einer Infiltrationstiefe von 1 mm hatten signifikant weniger positive Färbeergebnisse im Vergleich zu allen anderen Infiltrationstiefen zusammen ($p = 0,0002$, exakter Test nach Fisher) (siehe Tab. 3-47 und Abb. 3-23). Zur Schätzung des Anteils positiver Zellen bestand keine Assoziation.

Tab. 3-47 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 154$).

Infiltrationstiefe (mm)	Färbung				Test
	keine	fokal	$\leq 50\%$	$> 50\%$	
1	10	1	1	1	$p = 0,0002$
2-3	13	8	10	4	
4-5	7	6	8	5	
6-10	9	13	20	8	
> 10	4	10	9	7	

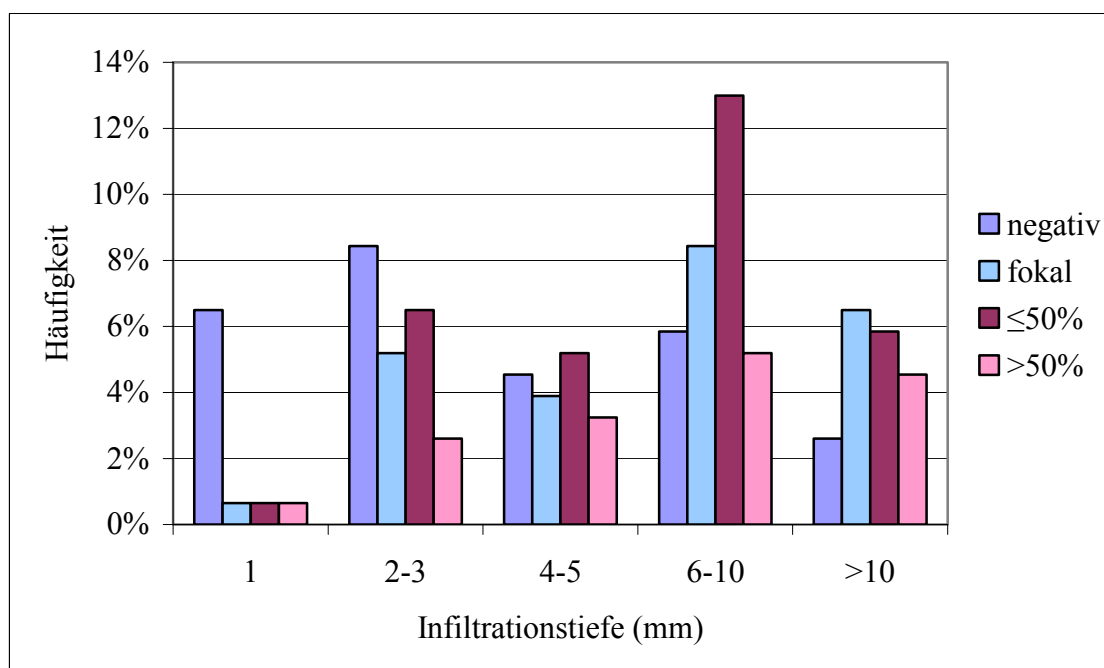


Abb. 3-23 Färbegergebnisse in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 154$).

Bei geringer Infiltrationstiefe waren weniger positive Färbegergebnisse vorhanden ($p = 0,0002$, exakter Test nach Fisher).

Nekrosen:

Das Auftreten von Nekrosen korrelierte positiv mit dem Färbegergebnis ($p = 0,04$, X^2 -Test), dabei bestand aber weder ein Unterschied zwischen dem Grad der Ausdehnung der Nekrosen noch zum prozentualen Anteil des positiven Tumorgewebes (siehe Tab. 3-48).

Tab. 3-48 Färbegergebnisse in Abhängigkeit von den Nekrosen ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Nekrosen	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	≤50%	>50%	
keine	36	24	33	18	$p = 0,04$
mittel	4	11	14	4	
ausgedehnt	3	3	2	3	

Differenzierungsgrad:

Unter den gut differenzierten Karzinomen (G1) fanden sich im Vergleich zu mäßig (G2) und gering differenzierten (G3) signifikant mehr negative Färbegergebnisse ($p = 0,004$, X^2 -Test) (siehe Tab. 3-49 und Abb. 3-24).

Tumoren mit hohem Anteil laminin-5-gamma-2 exprimierenden Zellen ($> 50\%$) hatten ein signifikant schlechteres Grading (G3) im Vergleich zu fokal oder $\leq 50\%$ laminin-5-gamma-2 positiven Tumoren ($p = 0,004$, X^2 -Test).

Tab. 3-49 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Grading	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	$\leq 50\%$	$> 50\%$	
G1	22	11	12	7	$p = 0,004$
G2	17	21	31	8	
G3	4	6	6	10	

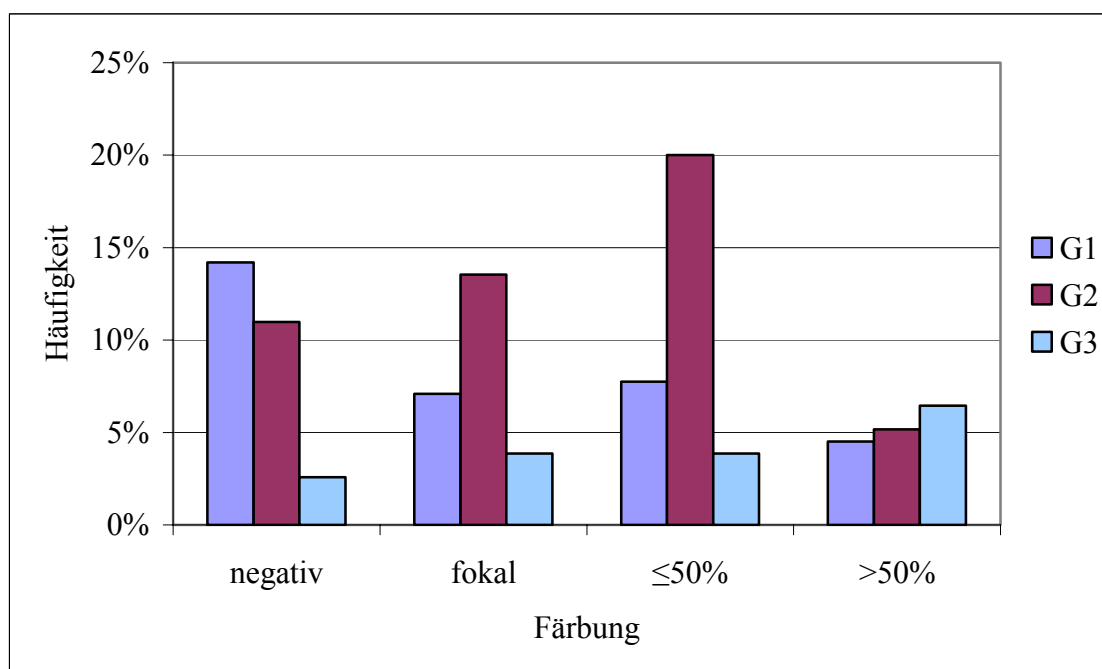


Abb. 3-24 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Grading ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 155$).

Signifikant häufiger G1-Tumoren bei negativen Färbeergebnissen ($p = 0,004$, X^2 -Test).

Lymphangiosis carcinomatosa:

Positive Färbungen fanden sich signifikant häufiger in Tumoren mit Lymphangiosis carcinomatosa als in Tumoren ohne Lymphangiosis carcinomatosa ($p = 0,0003$, X^2 -Test) (siehe Tab. 3-50 und Abb. 3-25).

Tab. 3-50 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa (n_{Vulvakarzinome} = 155).

Lymphangiosis carc.	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	≤50%	>50%	
keine	31	16	21	7	p = 0,0003
vorhanden	12	22	28	18	

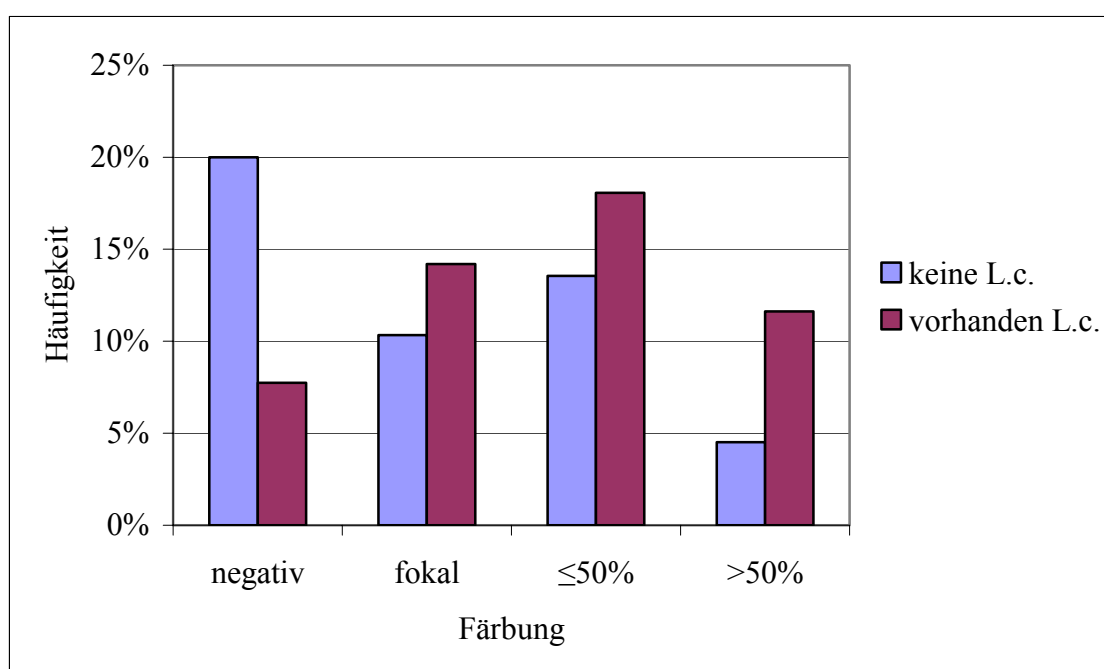


Abb. 3-25 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Lymphangiosis carcinomatosa (n_{Vulvakarzinome} = 155).

Signifikanter Zusammenhang zwischen positiv gefärbten Tumoren und Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa (p = 0,0003, X²-Test).

Hämangiosis carcinomatosa:

Karzinome mit Hämangiosis carcinomatosa waren alle angefärbt und damit signifikant häufiger positiv als Tumoren ohne Hämangiosis carcinomatosa (p = 0,02, exakter Test nach Fisher) (siehe Tab. 3-51).

Tab. 3-51 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Hämangiosis carcinomatosa (n_{Vulvakarzinome} = 155).

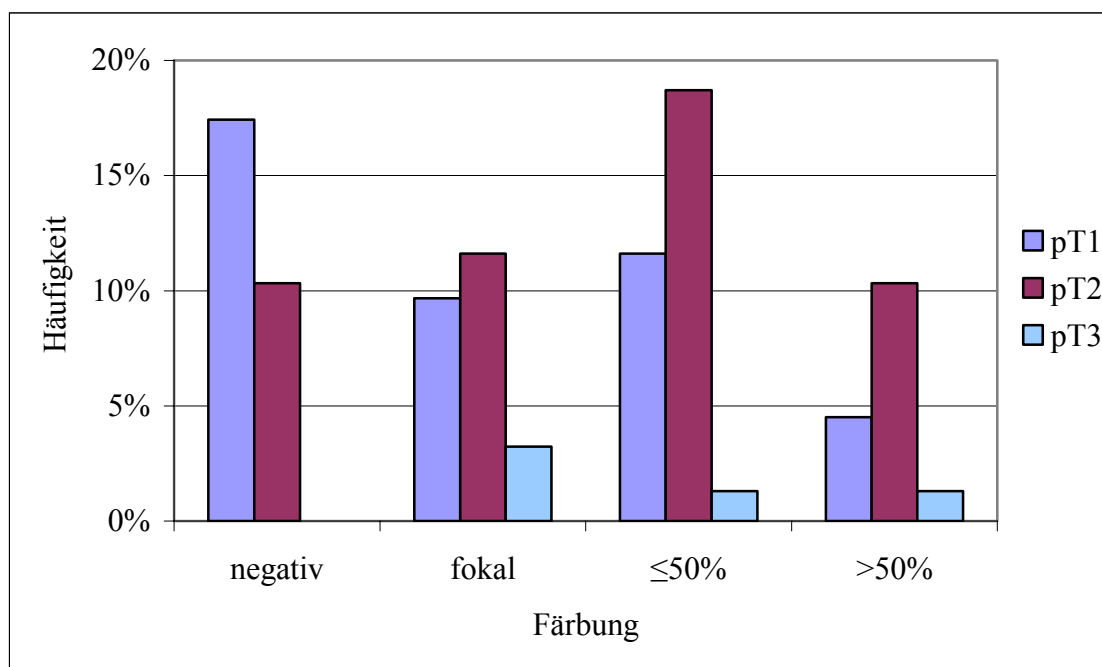
Hämangiosis carc.	Färbung				Test
	keine	fokal	≤50%	>50%	
keine	43	34	44	21	p = 0,02
vorhanden	0	4	5	4	

Lokales Tumorstadium:

pT1-Karzinome zeigten signifikant weniger positive Färbeergebnisse als pT2- und pT3-Karzinome ($p = 0,002$, X^2 -Test) (siehe Tab. 3-52 und Abb. 3-26).

Tab. 3-52 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom pT-Stadium (n_{Vulvakarzinome} = 155).

pT-Stadium	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	≤50%	>50%	
pT1	27	15	18	7	p = 0,002
pT2	16	18	29	16	
pT3	0	5	2	2	

**Abb. 3-26 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom pT-Stadium (n_{Vulvakarzinome} = 155).**

Signifikant weniger positive Färbungen im pT1 Stadium ($p = 0,002$, X^2 -Test).

3.2.5.3 Rezidiventwicklung in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen

Rezidive traten häufiger bei Tumoren mit positivem Färbeergebnis auf ($p = 0,01$, X^2 -Test) (siehe Tab. 3-53 und siehe Abb. 3-27).

Tab. 3-53 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Rezidiventwicklung ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

Rezidiv	Färbung				X ² -Test
	keine	fokal	$\leq 50\%$	$> 50\%$	
kein	31	20	21	11	$p = 0,01$
vorhanden	8	13	16	13	

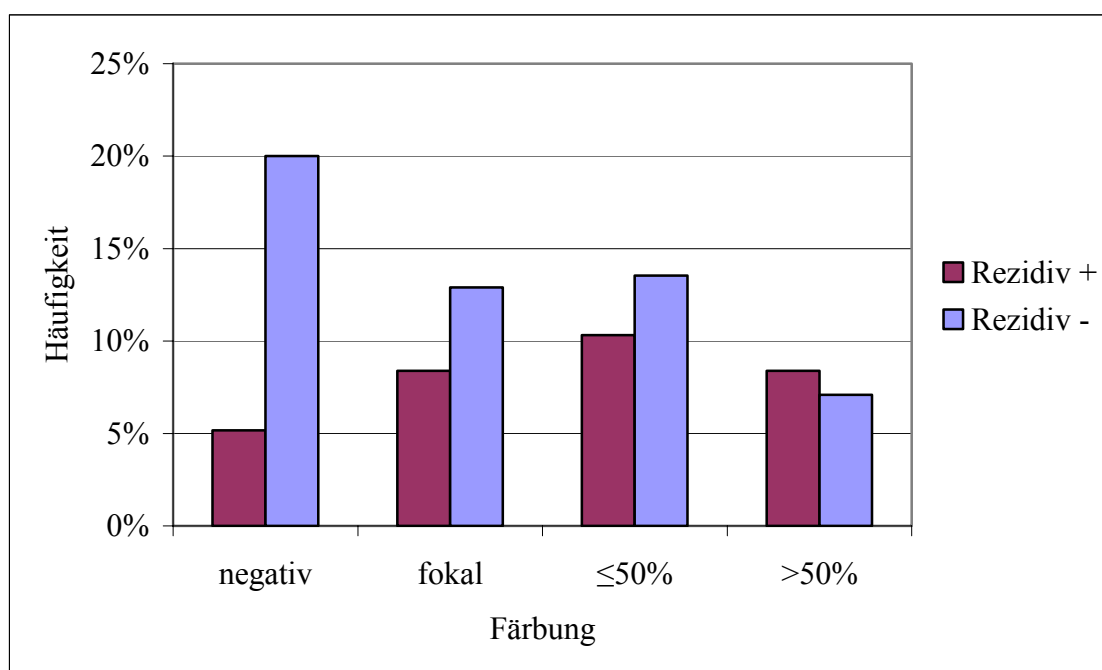


Abb. 3-27 Färbeergebnisse in Abhängigkeit von der Rezidiventwicklung ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

Signifikant weniger Rezidive unter den negativen Färbeergebnissen ($p = 0,01$, X^2 -Test).

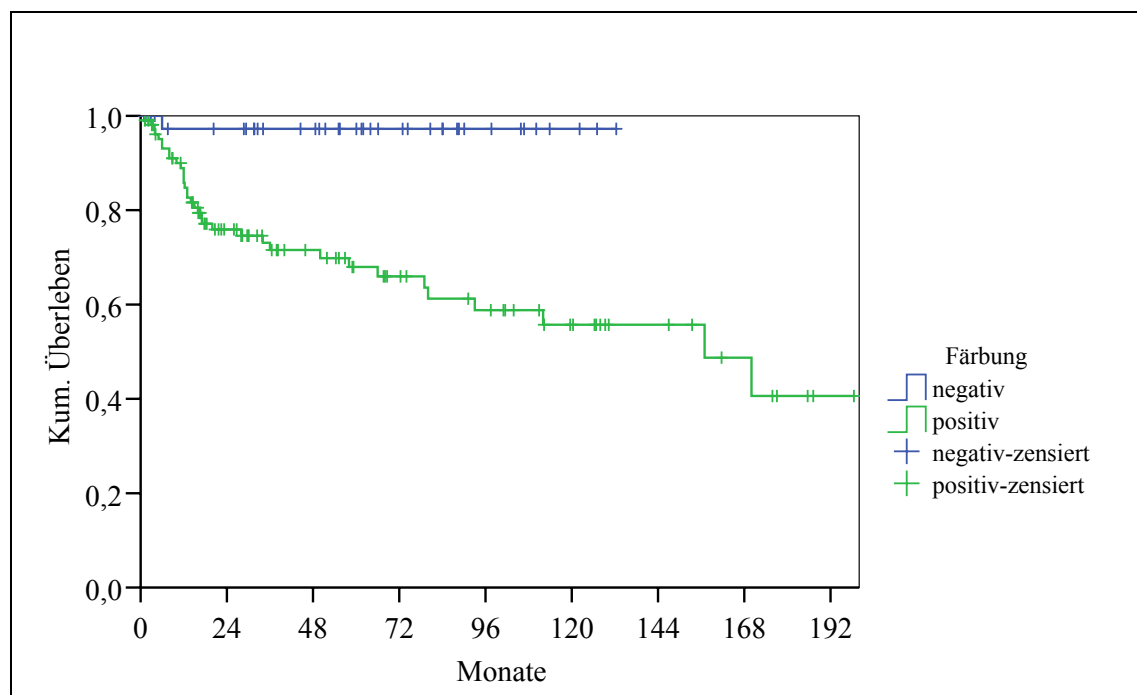
Die mittlere rezidivfreie Zeit war bei positiven Färbeergebnissen statistisch signifikant kürzer ($p = 0,01$, Log-Rank Test) (siehe Tab. 3-54).

Tab. 3-54 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 133$).

Färbung	Anzahl	rezidivfreies Intervall (Monate)
negativ	39	106 (± 8)
positiv	94	96 (± 10)

3.2.5.4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen

In der Gesamtüberlebensanalyse ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0005$, Log-Rank Test) zwischen negativen Färbeergebnissen und positiv gefärbten Karzinomen. Die 5-Jahresüberlebensrate sank bei laminin-5-gamma-2 positiven Tumoren auf 68%. (siehe Tab. 3-55 und Abb. 3-28).

**Abb. 3-28 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).**

Signifikant kürzeres Überleben bei laminin-5-gamma-2 positiven Tumoren ($p = 0,0005$, Log-Rank Test).

Tab. 3-55 Färbeergebnisse in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben ($n_{\text{Vulvakarzinome}} = 146$).

Färbung	Anzahl	5-Jahresüberlebens- rate (%)
negativ	40	97
positiv	106	68

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der Arbeit

Da das Vulvakarzinom ein relativ seltenes Karzinom ist, wurde es in den letzten Jahren im Vergleich zu anderen Karzinomen wenig histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Bei anderen Tumoren, wie dem Mammakarzinom, haben neuere Prognosefaktoren bereits entscheidend zum Krankheitsverständnis und zur Erstellung individueller Behandlungspläne beigetragen. So wäre es auch beim Vulvakarzinom wünschenswert, verlässliche Parameter zu finden, die an Hand von Biopsien oder Operationspräparaten Patientinnen in Risikogruppen einteilen ließen und zur Planung einer tumoradaptierten Therapie beitragen könnten.

Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit vulväre intraepitheliale Neoplasien III und Vulvakarzinome histologisch und immunhistologisch untersucht.

Die laminin-5-gamma-2 Kette, der bereits bei anderen Tumoren prognostische Relevanz zugesprochen wurde, wurde durch immunhistochemische Färbung dargestellt. Die Färbergebnisse wurden mit histopathologischen Parametern verglichen und die prognostische Wertigkeit überprüft.

4.2 Diskussion über die Ergebnisse der vulvären intraepithelialen Neoplasie

4.2.1 Histologie

Bei der Behandlung von vulvären intraepithelialen Neoplasien gibt es zwei Hauptprobleme. Zum einen die hohe Rezidivrate, die in dieser Untersuchung bei 33% liegt. Die Studie von van Seters et al. wertete 1736 Patienten aus, die wegen VIN III behandelt wurden, und fand bei 18-23% Rezidive (van Seters et al., 2005).

Zum anderen handelt es sich bei der vulvären intraepithelialen Neoplasie um eine prä-maligne Erkrankung, aus der sich ein Karzinom entwickeln kann. Aus diesen Gründen ist die Behandlung der vulvären intraepithelialen Neoplasie eine Herausforderung, bei der es auf der einen Seite das Auftreten von Rezidiven und das Risiko einer späteren Karzinomentstehung zu minimieren gilt, auf der anderen Seite eine möglichst minimalinvasive Therapie zu berücksichtigen ist, um die Rate postoperativer Komplikationen und psychosexueller Probleme so gering wie möglich zu halten.

In dieser Arbeit wurden die histologischen Parameter als mögliche Prognosefaktoren an der Rezidiventwicklung gemessen. Dabei bestand aber keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Rezidiven bei vulvären intraepithelialen Neoplasien und den histologischen Parametern. In der Studie von Seters et al. sank die Rezidivrate hingegen von 47% auf 17% bei nicht befallenen Resektionsrand (van Seters et al., 2005). Auch Modesitt et al. fanden in ihrer Untersuchung einen Zusammenhang zwischen dem Resektionsrand und dem Auftreten von Rezidiven heraus (46% versus 17%) (Modesitt et al., 1998). In der Studie von McNally wurde wie bei uns keine Assoziation des Resektionsrandes zur Rezidiventwicklung gefunden (McNally et al., 2002).

In dieser Arbeit verkürzte sich allerdings das rezidivfreie Intervall von 134 auf 80 Monate, wenn die vulväre intraepitheliale Neoplasie nicht in sano entfernt wurde.

Die rezidivfreie Zeit sank, wenn vulväre intraepitheliale Neoplasien nicht im Gesunden exzidiert wurden. Somit stellt sich die Frage, ob bei befallenen Resektionsrand eine Nachbehandlung entweder durch eine weitere Exzision oder durch Laserbehandlung sinnvoll erscheint. Allerdings ist eine Regression möglich (1,2%) und Progression nach Therapie gering (3,3%) (van Seters et al., 2005). Daraus resultiert die Möglichkeit der regelmäßigen Nachsorge und somit des frühzeitigen Erkennens des Lokalrezidivs.

Rezidive treten besonders häufig in den ersten zwei Jahren auf. In dieser Studie zeigten sich insgesamt ein Drittel der Rezidive innerhalb von zwei Jahren. Deswegen sollten sich die Patientinnen besonders in diesem Zeitraum alle 3 Monate einer sorgfältigen Nachsorge unterziehen.

4.2.2 Immunhistologie

Ziel dieser Arbeit war es die laminin-5-gamma-2 Kette darzustellen und deren Bedeutung zum einen als frühen Invasionsmarker und zum anderen als Prognosefaktor für Rezidive zu analysieren.

Die Expression der laminin-5-gamma-2 Kette wurde in 73 Präparaten von Patientinnen, die das erste Mal wegen einer vulvären intraepithelialen Neoplasie behandelt wurden, und in 24 Rezidivpräparaten untersucht.

Laminin-5-gamma-2 ließ sich als zytoplasmatische Färbung nachweisen. 22 der vulvären intraepithelialen Neoplasien der Primärbehandlung (30%) zeigten eine laminin-5-gamma-2 Expression: 15 exprimierten die laminin-5-gamma-2 Kette fokal, sechs in weniger als der Hälfte und ein Präparat in mehr als der Hälfte aller Neoplasiezellen. Von den 24 Rezidivpräparaten waren vier positiv.

Eine Studie von Nordström et al. untersuchten die laminin-5-gamma-2 Überexpression an Vorstufen des Vulvakarzinoms. Dabei beschrieben sie eine Zunahme der laminin-5-gamma-2 Kette im Zytoplasma vom normalen Epithel über vulväre intraepitheliale Neoplasien verschiedener Schweregrade bis zum invasiven Karzinom. (Nordström et al., 2002) Ähnliche Zusammenhänge wurden auch in der Arbeit von Skyldberg et al. für das Zervixkarzinom mit seinen Vorstufen gezeigt. Hier waren 22 von 23 CIN I und II und 21 von 32 CIN III Präparaten negativ für laminin-5-gamma-2. Hingegen waren alle mikroinvasiven und invasiven Karzinome positiv (insgesamt 35). (Skyldberg et al., 1999)

Beide Untersuchungen hatten zum Ziel mit der Anfärbung der laminin-5-gamma-2 Kette vulväre bzw. zervikale Dysplasien mit erhöhtem invasivem Potential ausfindig zu machen. Die laminin-5-gamma-2 Expression sollte einen sensitiven Marker für frühe Invasion darstellen. Dies wäre von großem Vorteil bei der Behandlung von vulvären intraepithelialen Neoplasien bei jungen Frauen, die eine lange Krankheitsgeschichte aufweisen und bei denen die histopathologische Beurteilung und die Therapiewahl oft Probleme bereiten (Nordström et al., 2002) oder bei CIN III bzw. mikroinvasivem Zervixkarzinom, die schwierig von einander zu unterscheiden sind und deswegen oft über- bzw. unterversorgt werden (Skyldberg et al., 1999).

Nordström et al. beobachteten an Hand einer kleinen Fallzahl (7 Patientinnen), dass VIN III Veränderungen, die mit dem Antikörper gegen laminin-5-gamma-2 reagieren, ein erhöhtes Risiko für den Übergang in ein invasives Karzinom zeigen. Des Weiteren gab es Unterschiede in der laminin-5-gamma-2 Expression zwischen präkanzerösen Läsionen, die sich über Jahre hinweg entwickelten, und Dysplasien, deren Entwicklungszeit in invasive Karzinome kurz war. So zeigten VIN I und II bei langen Krankheitsverläufen (10-30 Jahre) am Anfang keine laminin-5-gamma-2 Expression. Beim Fortschreiten der Erkrankung in ein Carcinoma in situ konnte die laminin-5-gamma-2 Kette nachgewiesen werden. Hinge-

gen wurde bei kurzer Entwicklungszeit eines invasiven Karzinoms von Anfang an die laminin-5-gamma-2 Kette exprimiert. (Nordström et al., 2002)

In der vorliegenden Arbeit kam es bei drei Patientinnen mit vulvärer intraepithelialer Neoplasie zur Progression der Erkrankung mit Entwicklung eines Karzinoms. Zwei der vorausgegangenen VIN-Läsionen waren negativ für laminin-5-gamma-2, so dass die laminin-5-gamma-2 Expression hier keinen frühen Invasionsmarker darstellte.

Ferner wurde die Assoziation des immunhistologischen Markers laminin-5-gamma-2 mit den histologischen Parametern und der Rezidiventwicklung untersucht. Es ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der laminin-5-gamma-2 Expression und den bekannten histologischen Parametern bzw. dem Auftreten von Rezidiven erkennen.

4.3 Diskussion über die Ergebnisse des Vulvakarzinoms

4.3.1 Histologie

Histologische Parameter sind an Hand von histologischen Paraffinschnitten eines Gewebes gut zu bestimmen und deshalb etablierte Prognosefaktoren des Vulvakarzinoms.

In der vorliegenden Arbeit wurden die histologischen Parameter an Vulvakarzinomen bestimmt und hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit dem Auftreten von inguinalen Lymphknotenmetastasen oder Rezidiven und Gesamtüberlebenszeit untersucht.

Entscheidend für die Überlebensprognose ist der Lymphknotenstatus. Diese Studie stellte ebenso wie andere Untersuchungen am Vulvakarzinom (Bosquet et al., 2005; Burger et al., 1995; Homesley et al., 1991; Rouzier et al., 2001; Smyczek-Gargya et al., 1997) einen statistisch signifikanten Abfall der 5-Jahresüberlebensrate fest, wenn die Lymphknoten metastatisch befallen sind.

Von den 109 Lymphonodektomierten in dieser Arbeit hatten über die Hälfte (57%) keine Lymphknotenmetastasen. In der Studie von Burger et al. waren sogar 70% und in der Untersuchung von Bosquet 65,8% der Lymphonodektomierten metastasenfrei (Bosquet et al., 2005; Burger et al., 1995).

Im Weiteren werden histologische Parameter erläutert, die für die Abschätzung des Risikos für positive Lymphknoten hilfreich sind.

In dieser Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Infiltrationstiefe, der Anzahl der Mitosen, dem Differenzierungsgrad (Grading), dem Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa, dem lokalen Tumorstadium (pT) und inguinalen Lymphknotenmetastasen. Preti et al. stellten in ihrer Studie bei univariater Analyse eine Abhängigkeit des Lymphknotenbefalls vom Tumordurchmesser, Grading, Gefäßinvasion und Infiltrationstiefe fest. Dabei fanden sich keine Lymphknotenmetastasen bei einer Infiltrationstiefe ≤ 2 mm. (Preti et al., 1993) In dieser Arbeit zeigten sich lediglich bei einer Infiltrationstiefe ≤ 1 mm keine Metastasen. Die Häufigkeit an befallenen Lymphknoten stieg mit zunehmender Infiltrationstiefe. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Homesley et al. (Homesley et al., 1993). Sie verzeichneten einen sprunghaften Anstieg des Lymphknotenbefalls bei Infiltrationstiefen ≥ 3 mm.

Rezidive traten bei 34% der Patientinnen auf. In anderen Studien lag die Zahl der Rezidive zwischen 12-37% (Coulter und Gleeson, 2003).

Es wäre von großem Nutzen, Patientinnen mit Hilfe von Prognosefaktoren in Risikogruppen einzuteilen und Patientinnen mit geringem Rezidivrisiko weniger aggressiv zu therapieren, da dies mit einer geringeren Morbiditätsrate und geringeren psychosexuellen Problemen verbunden wäre. Deswegen wurde in dieser Arbeit die prognostische Bedeutung der histologischen Parameter bezüglich des Auftretens von Rezidiven untersucht. Dabei lässt sich als Ergebnis konstatieren, dass nur das lokale Tumorstadium (pT) und die Tumorentfernung in sano mit der Rezidiventwicklung korreliert. Maggino et al. und Onnis et al. fanden in ihren Arbeiten noch andere Faktoren, wie die Infiltrationstiefe, den Tumordurchmesser, die Lymphangiosis carcinomatosa, das FIGO-Stadium und den metastatischen Lymphknotenbefall, die mit dem Risiko von Lokalrezidiven als auch anderen Rezidiven assoziiert sind (Maggino et al., 2000; Onnis et al., 1992). Diese Befunde entsprechen früheren Untersuchungsergebnissen von Heaps et al., die ebenfalls einen Zusammenhang der Infiltrationstiefe, der Tumordicke und darüber hinaus noch der Lymphangiosis carcinomatosa und des Wachstumsmusters mit der Rezidiventwicklung fanden. Die Tumorgöße und das Grading hingegen waren in ihrer Studie nicht mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert. (Heaps et al., 1990)

Es wurde auch der Einfluss der histologischen Parameter auf das rezidivfreie Intervall untersucht. Dabei ließ sich ein Zusammenhang zur Infiltrationstiefe, dem lokalen Tumorstadium (pT), der Karzinomentfernung in sano bzw. non in sano und dem Lymphknotenbefall feststellen. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Preti et al. in ihrer Studie (Preti et al.,

2000). Auch Pinto et al. fanden in ihrer Untersuchung ein Abnahme der rezidivfreien Zeitspanne bei höherem pT-Stadium heraus (Pinto et al., 2004).

Als wichtige prognostische Faktoren für die Gesamtüberlebenszeit erwiesen sich in dieser Studie die Infiltrationstiefe, der Differenzierungsgrad, der Nachweis einer Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa, das lokale Tumorstadium (pT), die Karzinomentfernung in sano bzw. non in sano und wie eingangs erwähnt das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen.

Die 5-Jahresüberlebensrate fiel um fast die Hälfte von 96% bei einer Infiltrationstiefe von 1 bis 4 mm auf 49% bei einer Infiltrationstiefe von über 9 mm. Rouzier et al. veröffentlichten eine Studie mit ähnlichen Ergebnissen (Rouzier et al., 2001). Sie verglichen minimal invasive Karzinome von einer Infiltrationstiefe ≤ 1 mm mit den übrigen und fanden dabei einen signifikanten Abfall der 5-Jahresüberlebensrate von 93% auf 46%.

Wurden die mittleren Überlebenszeiten der einzelnen Differenzierungsgrade verglichen, so zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Prognose vom Grading, d.h. je undifferenzierter das Karzinom, desto kürzer die mittlere Überlebenszeit und desto schlechter die Prognose. Dieses Ergebnis stimmt mit drei anderen Studien überein, die ebenfalls eine signifikante Abnahme der Überlebenszeit mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors fanden (Hoffmann et al., 1999; Kouvaris et al., 2001; Smyczek-Gargya et al., 1997).

Beim Vergleich der 5-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit vom pT-Stadium wurde ein deutlicher Rückgang von 94% bei pT1 auf 33% bei pT3 festgestellt. In der Studie von Pinto et al. fielen die Ergebnisse insgesamt besser aus, doch zeigt sich auch hier eine deutliche Prognoseverschlechterung (5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 100% bei pT1 im Vergleich zu 66% bei pT3) (Pinto et al., 2004).

Mit Hilfe dieser Untersuchung sollte die Rolle der histologischen Parameter aufgezeigt werden. Zusammen mit der entsprechenden Klinik der Patientinnen können sie einen entscheidenden Beitrag zur Individualisierung und tumoradaptierten Behandlung beitragen.

4.3.2 Immunhistologie

Die Bedeutung der Überexpression von laminin-5-gamma-2 wurde schon in anderen Tumoren, wie dem Adenokarzinom des Kolorektaltrakts (Lenander et al., 2003), des Magens (Koshikawa et al., 1999), des Pankreas (Soini et al., 1996), der Lunge (Moriya et al., 2001) und der Prostata (Hao et al., 2001) sowie im Plattenepithelkarzinom des Mundes (Kainulainen et al., 1997; Katoh et al., 2002; Ono et al., 1999) und des Ösophagus (Yamamoto et

al., 2001) dargestellt. An gynäkologischen Tumoren wurde laminin-5-gamma-2 bereits am Vaginalkarzinom (Hellman et al., 2000) und am Zervixkarzinom (Skyldberg et al., 1999) untersucht.

In den meisten Malignomen war laminin-5-gamma-2 an der Tumor-Stroma-Grenze aufzufinden. Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Yamamoto et al. diskutierten, dass es eine Kommunikation zwischen Karzinomzellen und umliegenden Stromazellen gibt, die es dem Tumor ermöglicht zu wachsen. Sie vermuteten, dass die laminin-5-gamma-2 Kette an der Tumor-Stroma-Grenze daran beteiligt sein könnte und somit die Tumorerkrankung unterstützt. (Yamamoto et al., 2001) Da laminin-5-gamma-2 bei Wundheilungsprozessen mitwirkt, stellte Moriya et al. die Theorie auf, dass invasiv wachsende Tumorzellen das genetische Programm für Wundheilung der normalen Zellen benutzen, das bei ihnen im Gegensatz zu normalen Zellen aber nicht selbstlimitierend ist (Moriya et al., 2001).

In dieser Studie wurde die laminin-5-gamma-2 Kette im Zytoplasma nachgewiesen.

Wie schon einleitend erwähnt befindet sich laminin-5 normalerweise extrazellulär an der Basalmembran, um Integrine wie $\alpha 3 \beta 1$ und $\alpha 6 \beta 4$ zu binden (Mizushima et al., 1998). Die Rolle der Expression im Zytoplasma ist hingegen unklar. Yamamoto et al. und Koshikawa et al. vermuteten, dass die laminin-5-gamma-2 Kette in Abwesenheit der beiden anderen Untereinheiten, der $\alpha 3$ und $\beta 3$ Kette, im Zytoplasma akkumuliert und nur ein Teil sezerniert wird (Koshikawa et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). Dieses würde mit der Beobachtung zusammenpassen, dass in einigen Studien die laminin-5-gamma-2 Kette extrazellulär nachgewiesen wurde (Moriya et al., 2001). Moriya et al. führten die Unterschiede im Nachweis von laminin-5-gamma-2 im Zytoplasma und / oder extrazellulär auf die unterschiedlichen Antikörper zurück, die möglicherweise verschiedene Epitope der laminin-5-gamma-2 Kette erkennen.

Die Bewertungsmethode für die laminin-5-gamma-2 Überexpression ist uneinheitlich. In einigen Studien wurden nur negative von positiven Färbeargebnissen unterschieden (Lennander et al., 2003; Yamamoto et al., 2001), in anderen wird die laminin-5-gamma-2 Expression hinsichtlich des Anteils der gefärbten Zellen semiquantitativ in verschiedene Kategorien eingeteilt (Hellman et al., 2000; Moriya et al., 2001; Nordström et al., 2002).

In dieser Arbeit waren von 155 Vulvakarzinomen 112 Präparate (72%) positiv, die sich auf folgende Kategorien verteilten: 38 Fällen (25%) exprimierten die laminin-5-gamma-2 Kette fokale, 49 (32%) in weniger als der Hälfte aller Tumorzellen und 25 (16%) in mehr als der Hälfte. 43 Karzinome (28%) waren komplett negativ.

Der Vorteil der semiquantitativen Auswertung liegt darin, dass hinsichtlich der Prognose genauer differenziert werden kann. So ergab sich zum Beispiel beim Auftreten von Rezidiven ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit davon, ob das Tumorgewebe fokal positiv oder über 50% positiv angefärbt war (39% versus 54%). Beim rezidivfreien Intervall oder beim Gesamtüberleben hingegen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den Subklassifikationen gefunden werden. Hier war nur die Differenzierung zwischen negativen und positiven Färbeergebnissen entscheidend.

Wie eingangs erwähnt, zeigte die laminin-5-gamma-2 Überexpression in vielen Malignomen prognostische Bedeutung. In den hier untersuchten Vulvakarzinomen zeigten die Färbeergebnisse zu vielen histologischen Parametern, wie der assoziierten Epithelveränderung, der Infiltrationstiefe, den Nekrosen, dem histologischen Differenzierungsgrad (Grading), der Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa sowie dem lokalen Tumorstadium eine Assoziation. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression der laminin-5-gamma-2 Kette Ausdruck einer schlechteren Prognose des Vulvakarzinoms ist.

Einige dieser Befunde decken sich mit früheren Untersuchungsergebnissen an anderen Tumoren.

So zeigten auch im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus die verschiedenen Infiltrationstiefen eine Assoziation mit den Färbeergebnissen (Yamamoto et al., 2001). Dabei war, wie bei unseren Ergebnissen, der Unterschied nur für negative versus positive Färbungen und nicht für die prozentual unterschiedlich angefärbten Tumorgewebe nachweisbar. Im Gegensatz zu einer Studie über das Plattenepithelkarzinom der Zunge, bei der der Anteil der gefärbten Zellen von Bedeutung war (Kato et al., 2002).

In dieser Arbeit über das Vulvakarzinom fanden sich bei mäßig (G2) und gering differenzierten (G3) Karzinomen ein signifikant höherer Anteil an laminin-5-gamma-2 Expression im Vergleich zu gut differenzierten (G1). Entsprechende Ergebnisse brachte die oben erwähnten Studie über das Zungenkarzinom zu Tage (Kato et al., 2002), in der ebenfalls eine Assoziation des histologischen Differenzierungsgrades zur Häufigkeit der Expression von laminin-5-gamma-2 Ketten bestand.

In einer Arbeit über das Plattenepithel des Ösophagus wiesen die Karzinome im pT1-Stadium, wie in dieser Studie, signifikant weniger laminin-5-gamma-2 Ketten auf (Yamamoto et al., 2001).

In dieser Untersuchung ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen und Expression der laminin-5-gamma-2 Kette. Dies entspricht

anderen Untersuchungen von Moriya et al. über das Adenokarzinom der Lunge und von Katoh et al. über das Plattenepithelkarzinom der Zunge, in denen Karzinome mit laminin-5-gamma-2 Expression auch keine Assoziation zur lymphatischen Streuung aufwiesen (Katoh et al., 2002; Moriya et al., 2001). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der immunhistochemische Nachweis von laminin-5-gamma-2 Überexpression unabhängig vom Nodalstatus eine Bedeutung für die Prognose der Patientinnen besitzt. Diese Hypothese müsste aber in einer multivariaten Analyse überprüft werden.

Rezidive traten häufiger bei Vulvakarzinomen mit positiven Färbeergebnissen auf. Dabei verkürzte sich die mittlere rezidivfreie Zeit von 106 Monaten auf 96 Monaten, wenn laminin-5-gamma-2 exprimiert wurde. Zum entsprechenden Ergebnis kamen Yamamoto et al. in ihrer Arbeit über das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Yamamoto et al., 2001).

In der Überlebensanalyse fand sich ein kürzeres Gesamtüberleben bei Nachweis von laminin-5-gamma-2. So sank die 5-Jahresüberlebensrate von 97% auf 68%. In anderen Karzinomen, wie dem hepatozellulärem Karzinom (Giannelli et al., 2003), dem Adenokarzinom der Lunge (Moriya et al., 2001) oder dem Plattenepithelkarzinom der Zunge (Katoh et al., 2002) verkürzte sich ebenfalls beim Nachweis der Überexpression der laminin-5-gamma-2 Kette die Überlebenszeit der Patienten.

Aufgrund der hier gemachten Beobachtungen über den Zusammenhang der laminin-5-gamma-2 Expression mit der Rezidivhäufigkeit und dem Gesamtüberleben erscheinen weitere Untersuchungen am Vulvakarzinom sinnvoll. So erwies sich zum Beispiel in einer multivariaten Analyse von Yamamoto et al. im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus der Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette als unabhängiger prädiktiver Faktor für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben (Yamamoto et al., 2001).

4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Parameter in vulvären intraepithelialen Neoplasien und Vulvakarzinomen histologisch und immunhistologisch untersucht. Es wurden interessante Zusammenhänge zwischen der laminin-5-gamma-2 Kette und den histologischen Parametern sowie der Rezidiventwicklung und der Überlebensprognose herausgefunden.

Die Aussagefähigkeit der gezeigten Zusammenhänge wird dadurch eingeschränkt, dass sie nur univariat ermittelt wurden. Der Nachweis von laminin-5-gamma-2 war mit histologi-

schen Parametern, wie Grading, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa assoziiert, die selber mit einer schlechteren Prognose korrelieren. Inwieweit darüber hinaus eine laminin-5-gamma-2 Expression einen unabhängigen prognostischen Parameter darstellt, muss sich in einer multivariaten Analyse zeigen.

Weitere immunhistologische Untersuchungen an großen Patientenkollektiven, insbesondere am Vulvakarzinom, das in dieser Studie interessante Ergebnisse gezeigt hat, sind sinnvoll, um den prädiktiven Wert zu erhärten.

Außerdem könnte eine immunhistologische Untersuchung mit einem Antikörper gegen alle drei Untereinheiten des laminin-5 durchgeführt werden, um so den Mechanismus der alleinigen Expression der laminin-5-gamma-2 Kette in Karzinomzellen besser zu verstehen.

Die immunhistologische Analyse ist eine Technik, die im klinischen Alltag leicht durchgeführt werden kann. So können vielleicht in Zukunft die immunhistologische Färbung mit laminin-5-gamma-2 Antikörper histologische Untersuchungen ergänzen und eine genauere Einschätzung der Prognose geben. Dies würde den Weg zu einer weiteren Individualisierung der Therapie und tumoradaptierten Behandlung ebnen.

5 Zusammenfassung

Das Vulvakarzinom und seine Vorstufen sind seltene Krankheitsbilder. Die operative Therapie ist Methode der Wahl beim Vulvakarzinom. Sie ist allerdings mit hohen postoperativen Komplikationen und psychosexuellen Problemen belastet. Probleme bei der Behandlung von vulvären intraepithelialen Neoplasien stellen vor allem die hohe Rezidivrate und das Risiko einer Karzinomentstehung dar. So ist es sowohl für die Therapie des Vulvakarzinoms als auch seiner Vorstufen wünschenswert, verlässliche Parameter zu finden, die eine Aussage über den wahrscheinlichen Verlauf der Krankheit erlauben und damit auch eine individualisierte, risikoadaptierte Therapie ermöglichen können.

In der vorliegenden Arbeit sollten neben klinischen und histologischen Merkmalen insbesondere der immunhistologische Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette im Hinblick auf die Prognose der vulvären intraepithelialen Neoplasie (VIN III) und des Plattenepithelkarzinoms der Vulva untersucht werden. Der immunhistochemische Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette wurde gewählt, da für diesen Marker bisher keine Ergebnisse an tumorösen Veränderungen der Vulva vorliegen.

Die laminin-5-gamma-2 Kette wird von invasiv wachsenden Zellen unterschiedlicher Tumoren im Zytoplasma exprimiert (Adenokarzinome des Dickdarms, des Magens und der Brust sowie Plattenepithelkarzinome der Zervix und der Mundhöhle). Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen einer Überexprimierung der laminin-5-gamma-2 Kette und geringer Gewebedifferenzierung, größerer Tiefeninfiltration, dem Auftreten von Metastasen und einer schlechteren Überlebensprognose nachgewiesen werden.

Folgende Fragestellungen sollten bei den Patientinnen mit VIN beurteilt werden:

1. Sind die bekannten histologischen Parameter mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert?
2. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit den bekannten histologischen Parametern assoziiert?
3. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert?
4. Kann mit der immunhistologischen Anfärbung der laminin-5-gamma-2 Kette die frühe Invasivität nachgewiesen werden?

Folgende Fragestellungen sollten bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Vulva bearbeitet werden:

1. Sind die bekannten histologischen Parameter mit dem Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Rezidiven und dem Gesamtüberleben assoziiert?
2. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit den bekannten histologischen Parametern assoziiert?
3. Ist der immunhistologische Marker laminin-5-gamma-2 mit dem Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Rezidiven und dem Gesamtüberleben assoziiert?

Nach einem festgelegten Merkmalkatalog wurden die anamnestischen und therapeutischen Daten aus den Krankenunterlagen der Patientinnen entnommen. Die histologischen Parameter wurden anhand von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Großflächenschnitten erhoben. Für den immunhistologischen Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette wurden die Gewebeblöcke herausgesucht, um neue Schnitte anzufertigen, die mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) und 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) gefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mit Abschätzung des Anteils der gefärbten Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen in Prozent.

Die statistische Analyse erfolgte univariat durch Prüfung auf Signifikanz mit dem χ^2 -Tests oder – wenn erforderlich – mit dem exakten Test nach Fisher. Die Überlebenskurven (rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben) wurden nach der Kaplan-Meier-Methode errechnet und mit dem Log-Rank-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Ein derartiger Unterschied wurde bei p-Werten kleiner 0,05 angenommen.

Die retrospektive Studie umfasste zwei Patientengruppen:

- 88 Patientinnen mit VIN aus der Zeit von 1991 bis 2002
- 155 Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Vulva von 1987 bis 2002

Alle Patientinnen wurden im angegebenen Zeitraum an der I. Frauenklinik der Universität München, Maistraße, behandelt.

Für die Patientinnen mit VIN zeigte nur das histologische Merkmal „Entfernung in sano / non in sano“ einen statistisch auffälligen Unterschied im rezidivfreien Überleben. Alle anderen histologischen Merkmale, einschließlich des immunhistologischen Nachweises der laminin-5-gamma-2 Expression, zeigten keinen Zusammenhang mit der Häufigkeit von Rezidiven.

Bei den Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Vulva korrelierten folgende histologischen Merkmale statistisch auffällig mit Nachweis von inguinalen Lymphknotenmetastasen: Infiltrationstiefe, Anzahl der Mitosen, Differenzierungsgrad, Lymphangiosis carcinomatosa und lokales Tumorstadium (pT). Der immunhistologische Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette zeigte hingegen keine Assoziation zur lymphatischen Metastasierung.

Das lokale Tumorstadium (pT) und die Entfernung in sano zeigten eine statistisch auffällige Korrelation mit der Rezidivhäufigkeit: 100% Rezidive bei pT3 versus 34% bei pT1 und pT2. 60% Rezidive bei Entfernung non in sano versus 31% bei Entfernung in sano.

Neben diesen beiden Merkmalen zeigten auch die Infiltrationstiefe und der Nachweis von inguinalen Metastasen einen statistisch auffälligen Unterschied im rezidivfreien Überleben. Karzinome, die laminin-5-gamma-2 exprimierten, zeigten sowohl häufiger Rezidive als auch eine kürzere mittlere rezidivfreie Zeit.

Ein statistisch auffälliger Unterschied im Gesamtüberleben ließ sich in Abhängigkeit von folgenden histologischen Merkmalen nachweisen: Infiltrationstiefe, Grading, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa, lokales Tumorstadium (pT), inguinaler Lymphknotenstatus sowie Karzinomentfernung im Gesunden.

Patientinnen, deren Karzinome laminin-5-gamma-2 exprimierten, hatten ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben gegenüber Patientinnen, deren Karzinome keine Expression aufwiesen (5-Jahresüberlebensrate 97% versus 68%).

Weiter konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden:

Laminin-5-gamma-2 war vor allem in Tumorzellen an der Tumor-Stroma-Grenze positiv nachweisbar.

Karzinome mit ungünstigen histologischen Parametern (Infiltrationstiefe > 1mm, G2 oder G3, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa) zeigten häufiger positive Ergebnisse für die laminin-5-gamma-2 Färbung.

Rezidive traten häufiger bei laminin-5-gamma-2 exprimierenden Tumoren auf.

Die Überlebenszeit war kürzer bei Patientinnen, deren Vulvakarzinom laminin-5-gamma-2 exprimieren.

Aus diesen zunächst univariat gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende vorläufige Schlüsse ziehen:

1. der Nachweis der laminin-5-gamma-2 Kette hat für die Prognose der vulvären intra-epithelialen Neoplasie keine Bedeutung.
2. Die Expression der laminin-5-gamma-2 Kette scheint mit einem aggressiveren Tumortyp und damit einer schlechteren Prognose des Vulvakarzinoms verbunden zu sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, welche Bedeutung die immunhistologische Darstellung der laminin-5-gamma-2 Kette in der Prognose der vulvären intra-epithelialen Neoplasie und des Vulvakarzinoms hat. Auf Grund der hier gewonnenen univariaten Ergebnisse scheinen weitere Untersuchungen mit multivariater Analyse und an größeren Patientenkollektiven sicher sinnvoll. So könnte in Zukunft vielleicht die immunhistologische Färbung mit dem laminin-5-gamma-2 Antikörper zusammen mit histologischen Untersuchungen eine genauere Einschätzung der Prognose erlauben und zur individuellen, tumoradaptierten Therapie beitragen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
e _i	erwartete Häufigkeit der Kategorie i
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G	Grading
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hpf	high power fields
HPV	Humane Papillomaviren
ing	inguinal
ISSVD	International Society for the Study of Vulvovaginal Disease
LE	Lymphonodektomie
Lk	Lymphknoten
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeit
Pap	Papanicolaou
PBS	phosphatgepufferte Saline
Rez	Rezidiv
Tab	Tabelle
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
UFK	Universitätsfrauenklinik

VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
vs	versus
±	Standardabweichung

7 Literaturverzeichnis

- Allgayer, H., Babic, R., Grützner, K. U., Beyer, B. C., Tarabichi, A., Schildberg, F. W., Heiss, M. M.** An immunohistochemical assessment of Cathepsin D in gastric carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 179-187
- Benedet, J. L., Bender, H., Jones III, H., Ngan, H. Y., Pecorelli, S.** FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 70: 209-262
- van Beurden, M., ten Kate, F. W., Tjong-A-Hung, S. P., de Craen, A. J., van der Vange, N., Lammes, F. B., ter Schegget, J.** Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17: 12-16
- Bjerregaard, B., Andreasson, B., Visfeldt, J., Bock, J. E.** The significance of histology and morphometry in predicting lymph node metastases in patients with squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 323-329
- Blake, P.** Radiotherapy and chemoradiotherapy for carcinoma of the vulva. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 649-661
- Bosquet, J. G., Magrina, J. F., Gaffey, T. A., Hernandez, J. L., Webb, M. J., Cliby, W. A., Podratz, K. C.** Long-term survival and disease recurrence in patients with primary squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 828-833
- Burger, M. P., Hollema, H., Emanuels, A. G., Krans, M., Pras, E., Bouma, J.** The importance of the groin node status for the survival of T1 and T2 vulval carcinoma patients. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 327-334
- Canavan, T. P., Cohen, D.** Vulvar cancer. *Am Fam Physician* 2002; 66: 1269-1274
- Cardosi, R. J., Bomalaski, J.J., Hoffman, M. S.** Diagnosis and management of vulvar and vaginal intraepithelial neoplasie. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001; 28: 685-702

- Coulter, J., Gleeson, N.** Local and regional recurrence of vulvar cancer: management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 663-681
- Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG).** Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen – Vulvakarzinom. 2004
- Dhar, K. K., Woolas, R. P.** Changes in the management of vulvar cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 529-542
- Diebold, J., Mayr, D.** Histopathologie. In: Kimmig, R., Kürzl, R.. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Vulvakarzinom. München: Tumorzentrum Manual, 2001: 13-15
- Engel, J., Schubert-Fritschle, G., Hölzel, D.** Epidemiologie. In: Kimmig, R., Kürzl, R.. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Vulvakarzinom. München: Tumorzentrum Manual, 2001: 1-4
- Engelmann, D. E., Andrade, L. A., Vassallo, J.** Human papillomavirus infection and p53 protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1159-1165
- Gaarenstroom, K. N., Kenter, G. G., Trimbos, J. B., Agous, I., Amant, F., Peters, A. A., Vergote, I.** Postoperative complications after vulvectomy and inguinofemoral lymphadenectomy using separate groin incisions. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 522-527
- Gastrell, F. H., McConnell, D. T.** Human papillomavirus and vulval intra-epithelial neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001; 15: 769-782
- Giannelli, G., Fransvea, E., Bergamini, C., Marinosci, F., Antonaci, S.** Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3684-3691
- Green, M. S., Naumann, R. W., Elliot, M., Hall, J. B., Higgins, R. V., Grigsby, J. H.** Sexual Dysfunction following vulvectomy. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 73-77
- Hantschmann, P.** Minimierung der Operationsmorbidity. Die Sentinel-Lymphonod-ektomie beim Vulvakarzinom – Quo vadis? *Zentralbl Gynakol* 2006; 128: 38-40

- Hantschmann, P., Beysiegel, S., Assemi, C., Kürzl, R.** Immunohistologic detection of nm23-H1 protein in squamous cell carcinoma of the vulva. *J Reprod Med* 2004; 49: 787-795
- Hantschmann, P., Beysiegel, S., Kürzl, R.** Squamous cell carcinoma of the vulva – expression of tumor proteases Cathepsin-D and Pro-Cathepsin-L. *J Reprod Med* 1998; 43: 933-942
- Hantschmann, P., Kürzl, R.** Regulation of apoptosis in squamous cell carcinoma of the vulva. *J Reprod Med* 2000; 45: 633-642
- Hantschmann, P., Lampe, B., Beysiegel, S., Kürzl, R.** Tumor proliferation in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 361-368
- Hantschmann, P., Sterzer, S., Jeschke, U., Friese, K.** P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosis. *Anticancer Res* 2005; 25: 1739-1745
- Hao, J., Jackson, L., Calaluce, R., McDaniel, K., Dalkin, B. L., Nagle, R. B.** Investigation into the mechanism of the loss of laminin 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) expression in prostate cancer. *Am J Pathol* 2001; 158: 1129-1135
- Hart, W. R.** Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20: 16-30
- Heaps, J. M., Fu, Y. S., Montz, F. J., Hacker, N. F., Berek, J. S.** Surgical-pathologic variables predictive of local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 309-314
- Hellman, K., Hellström, A.-C., Silfverswärd, C., Salo, S., Aspenblad, U., Nilsson, B., Frankendal, B., Tryggvasson, K., Auer, G.** Cancer of the vagina: Laminin-5 γ 2 chain expression and prognosis. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 391-396
- Hendricks, J. B., Wilkinson, E. J., Kubilis, P., Drew, P., Blaydes, S. M., Munakata, S.** Ki-67 expression in vulvar carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1994; 13: 205-210
- Hillemanns, P., Kimmig, R.** Ätiologische Bedeutung der humanen Papillomaviren (HPV) bei vulvären Neoplasien. In: Kimmig, R., Kürzl, R.. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Vulvakarzinom. München: Tumorzentrum Manual, 2001: 5-6

- Hoffmann, G., Casper, F., Weikel, W., Kümmerle, T., Pollow, B., Schaffrath, M., Hoffmann, M., Pollow, K.** Untersuchungen zu p53, UPA, PIA-1 und Ki-67 beim Vulvakarzinom. *Zentralbl Gynakol* 1999; 121:473-478
- Hopkins, M. P., Nemunaitis-Keller, J.** Carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001; 28: 791-804
- Hopkins, M. P., Reid, G. C., Vettrano, I., Morley, G. W.** Squamous cell carcinoma of the vulva: prognostic factors influencing survival. *Gynecol Oncol* 1991; 43: 113-117
- Homesley, H. D., Bundy, B. N., Sedlis, A., Yordan, E., Berek, J. S., Jahshan, A., Mortel, R.** Assessment of current international federation of gynecology and obstetrics staging of vulvar carcinoma relative to prognostic factors for survival (a Gynecologic Oncology Group study). *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 997-1004
- Homesley, H. D., Bundy, B. N., Sedlis, A., Yordan, E., Berek, J. S., Jahshan, A., Mortel, R.** Prognostic factors for groin node metastasis in squamous cell carcinoma of the vulva (a Gynecologic Oncology Group study). *Gynecol Oncol* 1993; 49: 279-283
- Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P., Bodmer, W. F.** Genetic pathways in colonrectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1986-2002
- Jhingran, A., Eifel, P.** Role of radiotherapy in the management of vulvar cancer. In: Luesley, D. M.. *Cancer and pre-cancer of the vulva*. London: Arnold, 2000: 120-134
- Jones, R. W., Rowan D. M., Stewart, A. W.** Vulvar intraepithelial Neoplasia – Aspects of the natural history and outcome in 405 women. In: *Obstet Gynecol* 2005; 106: 1319-1326
- Kagie, M. J., Ansink, A.** Vaginal intraepithelial neoplasia: presentation, diagnosis and management. In: Luesley, D. M.. *Cancer and pre-cancer of the vulva*. London: Arnold, 2000: 86-96

- Kagie, M. J., Kenter, G. G., Zomerdijk-Nooijen, Y., Hermans, J., Schuurin, E., Timmers, P. J., Trimbo, J. B., Fleuren, G.-J.** Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 178-183
- Kainulainen, T., Autio-Harmainen, H., Oikarinen, A., Salo, S., Tryggvason, K., Salo, T.** Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1997; 136: 331-336.
- Katayama, M., Sanzen, N., Funakoshi, A., Sekiguchi, K.** Laminin γ 2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer Res* 2003; 63: 222-229
- Katoh, K., Nakanishi, Y., Akimoto, S., Yoshimura, K., Takagi, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S.** Correlation between Laminin- 5 γ 2 Chain expression and epidermal growth factor receptor expression and its clinicopathological significance in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncology* 2002; 62: 318-326
- Kimmig, R., Kürzl, R.** Farbtafel. In: Kimmig, R., Kürzl, R.. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Vulvakarzinom. München: Tumorzentrum Manual, 2001: 45-48
- Kohlberger, P., Breitenacker, G., Gitsch, G., Sliutz, G., Kölbl, H., Tschachler, E., Reinthaller, A., Kainz, C.** Die p53-Überexpression als prognostischer Faktor beim Vulvakarzinom. *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch* 1996; 36: 40-41
- Koshikawa, N., Moriyama, K., Takamura, H., Mizushima, H., Nagashima, Y., Yanoma, S., Miyazaki, K.** Overexpression of laminin γ 2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 5596-5601
- Kouvaris, J., Kouloulis, V., Loghis, C., Sykiotis, C., Balafouta, M., Vlahos, L.** Prognostic factors for survival in invasive squamous cell vulvar carcinoma: a univariate analysis. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 51: 262-265

- Koyamatsu, Y., Yokoyama, M., Nakao, Y., Fukuda, K., Saito, T., Matsukuma, K., Iwasaka, T.** A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-551
- Küppers, V., Bender, H. G.** Neoplasien der Vulva. In: Küppers, V., Bender, H. G.. *Blickdiagnostik Vulva*. München: Urban & Fischer, 2003: 103-164
- Küppers, V., Bender, H. G.** Präneoplasien und Neoplasien der Vulva. In: Bender, H. G.. *Spezielle gynäkologische Onkologie I*. München: Urban & Fischer, 2001: 49-92
- Küppers, V., Stiller, M., Somville, T., Bender, H. G.** Risk factors for recurrent VIN. Role of multifocality and grade of disease. *J Reprod Med* 1997; 42: 140-144
- Kürzl, R.** Prätherapeutische Diagnostik. In: Kimmig, R., Kürzl, R.. *Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Vulvakarzinom*. München: Tumorzentrum Manual, 2001: 11-12
- Kürzl, R., Messerer, D.** Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva: a multivariate analysis. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 143-150
- Lavie, O., Comerci, G., Daras, V., Bolger, B. S., Lopes, A., Monaghan, J. M.** Thrombocytosis in women with vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 82-86
- Lenander, C., Roblick, U. J., Habermann, J. K., Öst, A., Tryggvason, K., Auer, G.** Laminin 5 $\gamma 2$ chain expression: a marker of early invasiveness in colorectal adenomas. *Mol Pathol* 2003; 56: 342-346
- Leminen, A., Forss, M., Paavonen, J.** Wound complications in patients with carcinoma of the vulva Comparison between radical and modified vulvectomies. *Eur J Obstet Gynecol Redrod Biol* 2000; 93: 193-197
- Lerma, E., Matias-Guiu, X., Lee, S. J., Prat, J.** Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53, and pRb.. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 191-197
- Maggino, T., Landoni, F., Sartori, E., Zola, P., Gadducci, A., Alessi, C., Soldà, M., Coscio, S., Spinetti, G., Maneo, A., Ferrero, A., Konishi de Toffoli, G.** Patterns of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* 2000; 89: 116-122

- McNally, O. M., Mulvany, N. J., Pagano, R., Quinn, M. A., Rome, R. M.** VIN 3: a clinicopathologic review. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 490-495
- Mizushima, H., Koshikawa, N., Moriyama, K., Takamura, H., Nagashima, Y., Hirahara, F., Miyazaki, K.** Wide distribution of laminin-5 $\gamma 2$ chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res* 1998; 50 Suppl 2: 7-14
- Modesitt, S. C., Groben, P. A., Walton, L. A., Fowler, W. C., van Le, L.** Expression of Ki-67 in vulvar carcinoma and vulvar intraepithelial neoplasia III: correlation with clinical prognostic factors. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 51-55
- Modesitt, S. C., Waters, A. B., Walton, L., Fowler, W. C., van Le, L.** Vulvar intraepithelial neoplasia III: occult cancer and the impact of margin status on recurrence. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 962-966
- Monaghan, J. M.** Surgical procedures in malignant vulvar disease. In: Ridley, C. M.. *The vulva*. Oxford: Blackwell Science, 1999: 293-306
- Moriya, Y., Niki, T., Yamada, T., Matsuno, Y., Kondo, H., Hirohashi, S.** Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in lung adenocarcinomas of small size. *Cancer* 2001; 91: 1129-1141
- Nauth, H. F.** Bösertige Veränderungen des weiblichen Genitales. In: Nauth, H. F.. *Gynäkologische Zytodiagnostik*. Stuttgart, 2002: 165-254
- Ngan, H. Y., Cheung, A. N., Liu, S. S., Yip, P. S., Tsao, S. W.** Abnormal expression or mutation of TP53 and HPV in vulvar cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 481-484
- Niki, T., Kohno, T., Iba, S., Moriya, Y., Takahashi, Y., Saito, M., Maeshima, A., Yamada, T., Matsuno, Y., Fukayama, M., Yokota, J., Hirohashi, S.** Frequent colocalization of Cox-2 and laminin-5 $\gamma 2$ chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1129-1141
- Nordström, B., Einhorn, N., Silfverswärd, C., Sjövall, K., Tryggvason, K., Auer, G.** Laminin-5 $\gamma 2$ chain as an invasivity marker for uni- and multifocal lesions in the lower anogenital tract. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 105-109
- Onnis, A., Marchetti, M., Maggino, T.** Carcinoma of the vulva: critical analysis of survival and treatment of recurrences. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1992; 19: 87-92

- Ono, Y., Nakanishi, Y., Ino, Y., Niki, T., Yamada, T., Yoshimura, K., Saikawa, M., Nakajima, T., Hirohashi, S.** Clinicopathologic significance of laminin-5 γ 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 1999; 85: 2315-2321
- Pinto, A. P., Schlecht, N. F., Pintos, J., Kaiano, J., Franco, E. L., Crum, C. P., Villa, L. L.** Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 856-865
- Preti, M., Micheletti, L., Barbero, M., Ghiringhello, B., Valentino, M. C., Nicolaci, P., Canni, M., Borgno, G., Segnan, N., Ronco, G.** Histologic parameters of vulvar invasive carcinoma and lymph node metastases. *J Reprod Med* 1993; 38: 28-32
- Preti, M., Ronco, G., Ghiringhello, B., Micheletti, L.** Recurrent squamous cell carcinoma of the vulva: clinicopathologic determinants identifying low risk patients. *Cancer* 2000; 88: 1869-1876
- Preti, M., van Seters, M., Sideri, M., van Beurden, M.** Squamous vulvar intraepithelial Neoplasia. *Clin Obstet Gynaecol* 2005; 48: 845-861
- Riede, U.-N., Wiestler, O. D., Müller, H.** Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E.. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2004: 338-384
- Rollason, T. P.** Pathology of invasive vulvar lesions. In: Luesley, D. M.. *Cancer and pre-cancer of the vulva*. London: Arnold, 2000: 30-46
- Rosenthal, A. N., Hopster, D., Ryan, A., Jacobs, I. J.** Immunohistochemical analysis of p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 251-256
- Rouzier, R., Morice, P., Haie-Meder, C., Lhomme, C., Avril, M.-F., Duvillard, P., Castaigne, D.** Prognostic significance of epithelial disorders adjacent to invasive vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 414-419
- Scheistroen, M., Tropé, C., Pettersen, E. O., Nesland, J. M.** p53 Protein expression in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* 1999; 85: 1133-1138
- Schnürch, H. G.** Vulvakarzinom – Diagnostik und Therapie. *Der Urologe – Springer Verlag* 2004; 43: 849-860

- Sedivy, R., Wolf, B., Kalipciyan, M., Steger, G. G., Karner-Hanusch, J., Mader, R. M.** Genetic analysis of multiple synchronous lesions of the colon adenoma-carcinoma sequence. *Br J Cancer* 2000; 82: 1276-1282
- van Seters, M., van Beurden, M., de Craen, A. J. M.** Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 645-651
- Sideri, M., Jones, R. W., Wilkinson, E. J., Preti, M., Heller, D. S., Scurry, J., Haefner, H., Neill, S.** Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology subcommittee. *J Reprod Med* 2005; 50: 807-810
- Sideri, M., Spinaci, L., Spolti, N., Schettino, F.** Evaluation of CO2 laser excision or vaporization for the treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1999; 75: 277-281
- Singer, A., Monaghan, J. M.** Vulvar intraepithelial Neoplasia. In: Singer, A., Monaghan, J. M.. *Lower genital tract precancer*. Oxford: Blackwell Science, 2000: 233-289
- Skyldberg, B., Salo, S., Eriksson, E., Aspenblad, U., Moberger, B., Tryggvason, K., Auer, G.** Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1882-1887
- Smyczek-Gargya, B., Volz, B., Geppert, M., Dietl, J.** A multivariate analysis of clinical and morphological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 43: 261-267
- Soini, Y., Maatta, M., Salo, S., Tryggvason, K., Autio-Harmainen, H.** Expression of laminin $\gamma 2$ chain in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol* 1996; 180: 290-294
- Tyring, S. K.** Vulvar squamous cell carcinoma: guidelines for early diagnosis and treatment. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: S17-23
- van der Velden, J.** Surgery in the primary management of vulvar cancer. In: Luesley, D. M.. *Cancer and pre-cancer of the vulva*. London: Arnold, 2000: 106-119
- Wilkinson, E. J.** Protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas and malignant melanomas of the vulva. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 51-56

Wittekind, C., Klimpfinger, M., Sobin, L. H. Gynäkologische Tumoren. In: Wittekind, C., Klimpfinger, M., Sobin, L. H.. TNM-Atlas – Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Medizin-Verlag, 2005: 227, Abb. 300a, b

Yamamoto, H., Itoh, F., Iku, S., Hosokawa, M., Imai, K. Expression of the $\gamma 2$ chain of laminin-5 at the invasive front is associated with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2001; 7: 896-900

Internet

1. www.krebsinfo.de/ki/epidaten/pdf/inz2001.pdf
2. http://pri.dakocytomation.com/laminin-5_brochure.pdf
3. www.dakocytomation.dk/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=106496001

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben. Dank freundlicher Unterstützung und großer Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde, hat es mir viel Freude bereitet, diese Arbeit zu erstellen. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. K. Friese, Direktor der I. Universitätsfrauenklinik, für die Möglichkeit in der histologischen Abteilung arbeiten zu dürfen. Die hervorragend strukturierte Abteilung und die guten Arbeitsbedingungen haben sicher zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. P. Hantschmann für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas. Mit der Vergabe dieses Themas führte er mich an die interessante Thematik der immunhistologischen Forschung heran. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die stetige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und konkrete Hilfestellung bei allen Problemen bedanken. Auch für die maßgebliche Unterstützung bei der Auswertung der histologischen und immunhistologischen Präparate möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Kürzl für die überaus kompetente Betreuung und die wertvollen Hinweise bei der Ausarbeitung.

Den Mitarbeitern der Immunhistologie für die herzliche Aufnahme in der Gruppe, für das harmonische Arbeitsklima und die Geduld, mir alles zu erklären, das dazu beigetragen hat, dass ich gerne ins Labor gegangen bin. Vor allem möchte ich mich bei Frau C. Kuhn und Frau A. Balle für die Zuschneidung der Präparatblöcke und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und konstruktive Betreuung bedanken.

Den Mitarbeiterinnen vom Strahlenarchiv für die Hilfsbereitschaft bei der Beschaffung der nötigen Patientenakten.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Isabelle Eisenhauer
geboren: am 14.04.1979 in München

Ausbildung

1989 – 1995	Gymnasium Pullach, München
1995 – 1998	St-Anna-Gymnasium, München <ul style="list-style-type: none">➤ Abitur im Juni 1998
1998 – 1999	Studium der Geographie an der Ludwig-Maximilian-Universität (LMU), München
1999 - 2006	Studium Medizin an der LMU, München <ul style="list-style-type: none">➤ Physikum im August 2001➤ 1. Staatsexamen im August 2002➤ 2. Staatsexamen im März 2005➤ 3. Staatsexamen im Mai 2006

Praktika und Famulaturen

09/1999	Pflegepraktikum (Innere Medizin – Kardiologie, Pulmologie, Onkologie), Krankenhaus Bogenhausen, München
04/2000	Pflegepraktikum (Kinderchirurgie), Dr. v. Haunersches Kinderspital der LMU, München
03/2002 – 04/2002	Famulatur (Chirurgie), Krankenhaus Maria Theresia , München
09/2002	Famulatur (Gynäkologie, Innere Medizin – Ambulanz), Southern Regional Hospital, Dangriga Belize
03/2003 – 04/2003	Famulatur (Gynäkologie), Praxisklinik München Nord, München
07/2003 – 08/2003	Famulatur (Innere Medizin – Kardiologie, Angiologie, Pneumologie), Charité Mitte – Universitätsklinikum der Humboldt-Universität, Berlin

Praktisches Jahr

- | | |
|-------------------|---|
| 04/2005 – 07/2005 | Gynäkologie |
| | ➤ Universitätsklinik Großhadern, München |
| | ➤ Hôpital Arnaud de Villeneuve – Universitätsklinik, Montpellier Frankreich |
| 08/2005 – 11/2005 | Chirurgie |
| | ➤ Chirurgische Klinik der LMU, München |
| | ➤ Royal Prince Alfred Hospital, Sydney Australien |
| 12/2005 – 02/2006 | Innere Medizin |
| | ➤ Universitätsspital Basel, Basel Schweiz |

Ärztliche Tätigkeit

- | | |
|--------------|---|
| seit 08/2006 | Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Kiel |
|--------------|---|